

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG

Fernanda Kegles

Pelotas, 2015

Fernanda Kegles

Avaliação da expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2015

Fernanda Kegles

Avaliação da expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium
pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30/11/2015

Banca examinadora:

.....
Prof. Dra. Sibeles Borsuk (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Ma. Karen Silva Leal

Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Me. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido

.....
Ma. Thaís Larré Oliveira

Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K26a Kegles, Fernanda

Avaliação da expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG / Fernanda Kegles. – 49f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientadora Sibeles Borsuk.

1. Biotecnologia. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
3. *Mycobacterium bovis* BCG. 4. *Linfadenite caseosa*. I. Borsuk, Sibeles.
II. Título.

CDD: 616.9264

Dedico este trabalho a minha mãe, pela sua dedicação, amor, incentivo e apoio. Com toda minha gratidão, honra e amor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, Noris Regina Kegles Teixeira, por tudo que fez por mim, por ter sido além de minha mãe, o meu pai. Por ser essa mulher batalhadora e maravilhosa, que buscou sempre me dar a melhor educação, além do seu carinho, amor e dedicação;

À minha avó Nelly Kegles Teixeira, por todo seu afeto e incentivo;

Ao meu namorado, Uriel Secco Londero, por toda paciência, ajuda, amor e companheirismo;

À minha orientadora Profa. Dra. Sibebe Borsuk, pela oportunidade e orientação. Por incentivar novos conhecimentos, e ser um exemplo profissional e pessoal;

A Karen Silva Leal, por toda a ajuda, paciência e conhecimentos repassados;

A Jéssica Waldman por toda amizade, pelas horas de estudos, pelo companheirismo do início da faculdade, e do final dela, por todas as dúvidas tiradas e ajudas em trabalhos. Uma amizade que começa na faculdade e vai para a vida;

Ao Alex Pereira Rodrigues pela grande ajuda que me deu no início do estágio, por ser minha dupla em tantas provas e trabalhos, pelo seu companheirismo e, principalmente, pela sua enorme amizade;

A Luisa Reinhardt Ugoski e Nathalia Stark Pedra por toda amizade ao longo dessa jornada;

A Camila Vaz Levien, Elisa Rodrigues Knabach, Gabriela Costa Martins, Juliana Cavalheiro Rodighiero, Marina Pizarro Dias da Costa e Nathalia Ribeiro Jorge da Silva por serem minhas *tops*, e apesar de toda a distância dos diferentes cursos, estarem sempre presentes na minha vida;

À minha família e amigos, por terem me apoiado com tanto amor e carinho;

Meu muito obrigada!

“... todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade.

... não se curvem às críticas insensatas, descomedidas, de pessoas que nem sempre têm consciência do seu momento.

Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão sempre vencedores”.

M. Gandhi

Resumo

KEGLES, Fernanda. **Avaliação da expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG.** 2015. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva responsável por causar a Linfadenite Caseosa, uma doença infectocontagiosa crônica responsável por sérias perdas econômicas na ovinocaprinocultura. A imunização é a melhor medida preventiva, entretanto, ainda não existe uma vacina eficiente e protetora para o controle desta doença. As vacinas recombinantes são uma estratégia que pode ser promissora, dentre os diferentes tipos pode-se citar as vetorizadas como o *Mycobacterium bovis* BCG. O sequenciamento do genoma de diversas cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, possibilitou a identificação de novos alvos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas vacinas, entre eles destaca-se o gene *cp1002_0126a* que codifica para uma provável proteína secretada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína CP0126a de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Para isso, o gene *cp0126a* foi amplificado, e clonado nos vetores de expressão pUS977 e pUS2000, contendo os promotores pAN e 18kDa, respectivamente. Os clones recombinantes foram selecionados e transformados em *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. A análise da expressão da proteína recombinante foi realizada através de *Western blot*. A proteína CP0126a foi expressa em *Mycobacterium bovis* BCG sob controle dos dois promotores onde foi confirmada a antigenicidade da proteína. Novos testes serão realizados, incluindo o estudo em modelo animal, para a possível obtenção de uma vacina promissora e eficaz, para o controle da Linfadenite Caseosa nos rebanhos de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis* BCG; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Linfadenite Caseosa.

Abstract

KEGLES, Fernanda. **Evaluation of CP0126a protein expression of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Mycobacterium bovis* BCG.** 2015. 48f. Course Conclusion Work – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Corynebacterium pseudotuberculosis is a gram-positive bacterium responsible for causing Caseous Lymphadenitis, a chronic infectious disease responsible for serious economic losses in sheep and goat farming. Immunization is the best preventive measure, however, there is still no effective and protective vaccine for the control of this disease. Recombinant vaccines are a strategy that can be promising, among the different types can cite the vectorized *Mycobacterium bovis* BCG. The sequencing of the genome of several strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, allowed the identification of novel targets which can be used for the development of new vaccines, among them the *cp1002_0126a* gene that encode a possible secreted protein. The objective of this study was to evaluate the expression of the protein CP0126a of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. For this, the *cp0126a* gene was amplified and cloned into the expression vector pUS977 and pUS2000 containing the PAN and 18kDa promoters, respectively. Recombinant clones were selected and transformed into *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Analysis of recombinant protein expression was performed by *Western blot*. The CP0126a protein was expressed in *Mycobacterium bovis* BCG under the control of two promoters where the antigenicity of the protein was confirmed. Further tests are performed, including the study in an animal model for the possible obtaining a promising and effective vaccine for the control of Caseous Lymphadenitis in flocks of small ruminants.

Key-words: *Mycobacterium bovis* BCG; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Caseous Lymphadenitis.

Lista de Figuras

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Imagem da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR | 34 |
| Figura 2 | Imagem da caracterização dos clones recombinantes por digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição <i>HindIII</i> e <i>XbaI</i> | 35 |
| Figura 3 | Imagem do SDS-PAGE para avaliação da expressão da proteína recombinante | 36 |
| Figura 4 | Imagem do <i>Western blot</i> avaliando a expressão da proteína CP0126a em <i>M. bovis</i> BCG Pasteur utilizando soro policlonal anti-CP0126a | 36 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|------------------------------|---|
| v/v | Volume do Solute por Volume da Solução |
| μF | Microfarads |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| μM | Micromolar |
| BCG | Bacilo Calmette-Guérin |
| C | Citosina |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |
| CaCl_2 | Cloreto de Cálcio |
| CD8 | Citotóxica |
| CMNR | <i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus</i> |
| CP0126a | Proteína 0126a de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |
| <i>cp0126a</i> | Gene 0126a de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico |
| DO | Densidade Óptica |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> Ensaio Imunoenzimático |
| G | Guanina |
| H_2O | Água |
| HCl | Cloreto de Hidrogênio |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IL | Interleucinas |
| INF | Interferon |
| Kb | Quilobase |
| kDa | Quilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LC | Linfadenite Caseosa |
| <i>M. bovis</i> | <i>Mycobacterium bovis</i> |
| mg/mL | Miligramas por Mililitros |

| | |
|----------|--|
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> Complexo Principal de Histocompatibilidade |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanômetro |
| ng | Nanograma |
| OADC | <i>Oleic Albumin Dextrose Catalase</i> Complexo Dextrose Albumina e Ácido Oléico |
| °C | Grau Celsius |
| pb | Pares de Base |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> Tampão Fosfato-Salino |
| PBS-T | <i>Phosphate Buffered Saline and Tween-20</i> Tampão Fosfato-Salino e Tween-20 |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| rpm | Rotação por Minuto |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> Dodecil Sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> Separação de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> Fator de Necrose Tumoral |
| Tris | Tris Hidroximetil Aminometano |
| U | Unidade |
| V | Volt |
| x | Vezes |

Lista de Símbolos

% Porcentagem

α Alfa

β Beta

γ Gama

Ω Ohm

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 Introdução | 14 |
| 2 Objetivo Geral | 16 |
| 2.1 Objetivos Específicos | 16 |
| 3 Revisão Bibliográfica | 17 |
| 3.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | 17 |
| 3.1.1 Propriedades Bioquímicas | 18 |
| 3.2 Linfadenite Caseosa | 18 |
| 3.2.1 Impactos Econômicos | 19 |
| 3.2.2 Epidemiologia e Transmissão | 19 |
| 3.2.3 Patogenia e Imunologia | 20 |
| 3.2.4 Sinais Clínicos | 22 |
| 3.2.5 Diagnóstico | 23 |
| 3.2.6 Tratamento | 24 |
| 3.2.7 Proxilaxia | 24 |
| 3.2.8 Vacinas | 25 |
| 3.2.8.1 Gene <i>cp1002_0126a</i> | 26 |
| 3.3 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG | 26 |
| 4 Materiais e Métodos | 29 |
| 4.1 Cepas e condições de cultivo | 29 |
| 4.2 Amplificação do gene <i>cp0126a</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 29 |
| 4.3 Ligação do gene <i>cp0126a</i> aos vetores pUS977 e pUS2000 | 30 |
| 4.4 Preparo das células competentes de <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.5 Transformação por eletroporação em <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.6 Seleção dos clones recombinantes | 31 |
| 4.7 Produção do soro policlonal | 31 |
| 4.8 Transformação dos clones recombinantes em BCG Pasteur | 32 |
| 4.8.1 Preparo para <i>Western blot</i> | 32 |
| 4.9 Avaliação da expressão da proteína CP0126a por <i>Western blot</i> | 33 |
| 5 Resultados | 34 |
| 5.1 Obtenção do gene <i>cp0126a</i> | 34 |
| 5.2 Caracterização dos clones recombinantes | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante em <i>M. bovis</i> BCG Pasteur | 35 |
| 6 Discussão | 37 |
| 7 Conclusão | 39 |
| Referências | 40 |

1 Introdução

A ovinocaprinocultura apresenta-se em expansão no Brasil. O país possui um elevado rebanho de caprinos e ovinos, sendo sua maioria localizado nas zonas semi-áridas da região Nordeste, onde são exploradas, normalmente, para subsistência familiar (CORDEIRO, 1998; QUINTANS, 1995). Tendo em vista a importância socioeconômica dessa atividade, as doenças que acometem estes pequenos ruminantes tornam-se sérios problemas aos produtores (SONGER et al., 2005; WILLIAMSON, 2001).

Entre essas doenças, está a Linfadenite Caseosa (LC), uma doença infectocontagiosa, de ocorrência mundial, caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais (PATON et al., 2003; WILLIAMSON, 2001). Esta é uma enfermidade crônica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa pleomórfica, não esporulada, sem motilidade e anaeróbica facultativa (D'AFONSECA et al., 2010).

A LC causa sérias perdas econômicas na ovinocaprinocultura em decorrência da alta prevalência, como redução na capacidade reprodutiva e na produção de leite, carne e lã, e ainda desvalorização da pele devido a cicatrizes advindas dos abscessos (D'AFONSECA et al., 2008). Na forma visceral, a doença pode atingir órgãos o que resulta no emagrecimento e na condenação de carcaças dos animais (KIMBERLING, 1988; MEYER et al., 2010).

Considerando que não há um tratamento eficaz contra esta doença, e a precariedade no manejo dos animais na maioria das propriedades (GUIMARÃES et al., 2011), a medida preventiva ideal seria a imunoprofilaxia (DORELLA et al., 2006a). No entanto, ainda não existe uma vacina eficiente e protetora para o controle da LC.

Visando a obtenção de uma vacina eficaz, diversas estratégias têm sido utilizadas, dentre elas as vacinas recombinantes vetorizadas que podem induzir níveis de proteção satisfatórios. Dentre os diversos tipos destas vacinas é possível citar o *Mycobacterium bovis* BCG, que já se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias outras enfermidades (BASTOS et al., 2009; DENG et al., 2014; RIZZI et al., 2012).

Além disso, diferentes alvos vacinais têm sido analisados, a partir de dados de sequenciamento de *C. pseudotuberculosis* e identificadas algumas proteínas imunogênicas. É possível destacar a CP0126a, uma proteína hipotética e secretada identificada através de uma análise de pan-exoproteoma de cinco cepas de *C. pseudotuberculosis* (1002, C231, I19, FRC41 e PAT10) e também por uma identificação de epítomos MHC (SANTOS et al., 2012).

Dessa forma, este trabalho de conclusão de curso tem como objetivo avaliar a expressão da CP0126a de *C. pseudotuberculosis* em *M. bovis* BCG Pasteur.

2 Objetivo Geral

Avaliar a expressão da proteína CP0126a de *C. pseudotuberculosis* em *M. bovis* BCG Pasteur.

2.1 Objetivos Específicos

- Clonar o gene *cp0126a* nos vetores de expressão pUS977 e pUS2000;
- Construir *M. bovis* BCG recombinante;
- Avaliar a expressão da proteína rCP0126a em *M. bovis* BCG Pasteur;

3 Revisão Bibliográfica

3.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo de actinomicetos, denominado CMNR, juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As espécies bacterianas pertencentes a este grupo compartilham características muito particulares, como a organização específica da parede celular, sua espessura, presença de peptideoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, e o alto conteúdo G+C do genoma (47–74%) (DORELLA et al., 2006a; KONEMAN et al., 2008; SONGER et al., 2005).

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva, parasita intracelular facultativo, sua forma pleomórfica varia desde cocóides a bastões filamentosos e medem 0,5µm a 0,6µm por 1µm a 3µm de tamanho, apresentam-se aos pares ou formando grupamentos irregulares em paliçada, devido à grande quantidade de lipídeos presentes na sua parede celular, especialmente o ácido micólico. Este microrganismo possui fímbrias, é imóvel, não possui cápsula e não esporula (JONES & COLLINS, 1986). É anaeróbia facultativa e possui condições ótimas de crescimento a 37°C em pH entre 7,0 e 7,2 podendo se multiplicar a uma variação de pH de 7,0 a 8,0 (BATEY, 1986b; BUXTON E FRASIER, 1977). Tem um crescimento inicialmente espaçado na superfície do ágar e, posteriormente, se organiza em colônias pequenas, brancas e opacas, de crescimento concêntrico. O crescimento em meio líquido desenvolve-se como depósitos granulares, com uma película na superfície (DORELLA et al., 2006b; MUCKLE E GYLES, 1982).

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa, também conhecida como “mal do carço” ou “falsa tuberculose”, essa enfermidade acomete populações de pequenos ruminantes em todo o mundo (PATON et al., 2003; WILLIAMSON, 2001). Além de caprinos e ovinos, *C. pseudotuberculosis* é capaz de infectar outras espécies de animais, como equinos, bovinos, suínos, camelídeos e humanos, o que demonstra seu potencial zoonótico (PEEL et al., 1997; SELIM, 2001; WILLIAMSON, 2001; YERUHAM et al., 2004). A maioria das infecções humanas descritas na literatura envolveu o contato direto com animais doentes ou a exposição a produtos de animais contaminados (DORELLA et al., 2006a).

3.1.1 Propriedades Bioquímicas

As reações bioquímicas de isolados de *C. pseudotuberculosis* são caracterizadas pela produção de urease, redução de nitrato a nitrito e, principalmente, pelas suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido, sem produção de gás, a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose (BUXTON E FRASER, 1977; HOLT et al., 1994; MERCHANT E PACKER, 1967). Não possuem atividades proteolíticas, sendo incapazes de hidrolisar gelatina e digerir caseína. Essa bactéria apresenta reações bioquímicas positivas para fosfolipase D e catalase, enquanto que para oxidase demonstra resultado negativo, e é beta-hemolítica (ANDERSON et al., 2004; BUXTON E FRASER, 1977). A produção de nitrato redutase foi utilizada por Biberstein e colaboradores (1971) para distinguir o biovar equi (isolado de equino e bovino; redução de nitrato positiva) do biovar ovis (isolado de ovino e caprino; redução de nitrato negativa).

3.2 Linfadenite Caseosa

A Linfadenite Caseosa (LC) foi descrita pela primeira vez em 1934, na Austrália, por Churchward e se caracteriza como uma doença crônica infectocontagiosa de ovinos e caprinos (COLLETT et al., 1994; GASKIN e GUSS, 1992). A LC é caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais. A formação dos abscessos superficiais ocorre, principalmente, em nódulos linfáticos parotídicos, submandibulares, poplíteos, pré-crurais, supramamários, pré-escapulares e em tecidos subcutâneos, sendo a forma clínica predominante. Na forma visceral, os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos mediastínicos e bronquiais, podendo atingir órgãos internos como o fígado, baço, rins e pulmões (MERCHANT E PACKER, 1967; PIONTKOWSKI E SHIVVERS, 1998; SCOTT, 2007). Além disso, as infecções podem ser assintomáticas, dificultando o diagnóstico e as análises epidemiológicas sobre sua prevalência (ARSENAULT et al., 2003; BUXTON E FRASER, 1977; PATON et al., 1994).

3.2.1 Impactos Econômicos

O Brasil é o 8º maior criador de caprinos e ovinos no mundo. O rebanho brasileiro de caprinos e ovinos foi estimado, em 2014, em 8,8 milhões e 17,6 milhões de cabeças, respectivamente. O número de cabeças de caprinos cresceu 0,8%, enquanto o crescimento de ovinos foi de 1,9% quando comparados ao ano de 2013 (IBGE, 2014).

Essa doença é causada pela bactéria *C. pseudotuberculosis* e causa perdas econômicas aos criadores de pequenos ruminantes em todo o mundo (DORELLA et al., 2006a). A LC causa perda de peso e de valor comercial das peles, redução da capacidade reprodutiva e na produção de leite. Dessa forma, os prejuízos provocados por esta enfermidade são de grande importância, já que além de trazer prejuízos para as indústrias de derivados da ovinocaprinocultura, também afetam a cultura de subsistência básica para o pequeno produtor (AIELLO et al., 1998; DORELLA et al., 2009a; SONGER et al., 2005; WILLIAMSON, 2001).

3.2.2 Epidemiologia e Transmissão

A LC é mundialmente distribuída, principalmente nas áreas de grandes criações de pequenos ruminantes, e especialmente em regiões tropicais e subtropicais, como a Austrália e os Estados Unidos (ARSENAULT et al., 2003; DORELLA et al., 2006a; WILLIAMSON, 2001). No Brasil se apresenta de forma endêmica, possuindo uma prevalência clínica de 30%. Os estados da região Nordeste são os mais afetados por possuírem uma alta concentração de rebanhos caprinos e por sua vegetação espinhosa (RIBEIRO et al., 2001).

A prevalência varia quando o fator hospedeiro é analisado, sendo maior em ovinos do que em caprinos. No entanto, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, refletindo uma maior exposição aos fatores de risco (AL-RAWASHDEH et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002).

Diversos estudos têm sido realizados para buscar estabelecer a incidência e a prevalência da LC nos rebanhos mundiais, com o intuito de avaliar a sua distribuição e as perdas econômicas causadas pela doença. Contudo, algumas dificuldades são

encontradas, como a forma inaparente da doença e seu longo período de incubação, tornando os dados escassos (ALVES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009).

A doença apresenta um período longo de incubação até o aparecimento dos abscessos, podendo variar de 25 a 147 dias ou mais (QUINN et al., 2005). A introdução de animal infectado em um rebanho sadio, leva ao aparecimento dos abscessos no período de dois a três anos. Uma vez introduzida a doença no rebanho, a erradicação se torna mais difícil (AYERS, 1977).

Normalmente, essa doença é introduzida nos rebanhos sadios através de animais adquiridos de rebanhos com histórico de infecção por *C. pseudotuberculosis*, que constituem a fonte de infecção, e uma vez presente no rebanho, a bactéria pode se espalhar rapidamente para o restante dos animais (CASTRO, 2009). A disseminação da LC pode ocorrer pelo contato direto com material purulento resultante do rompimento dos abscessos superficiais, por aerossóis provenientes de descargas oro-nasais de animais com abscessos pulmonares, ou através da presença de bactérias vivas no ambiente (RADOSTITS et al., 2002).

O patógeno pode sobreviver por um longo período no ambiente, sendo oito meses no solo, quatro meses em galpões de tosquia e dois meses em feno e materiais contaminados, além disso, ele é resistente a baixas temperaturas e locais úmidos, o que influencia na disseminação da doença em criações que já tiveram algum histórico de LC (RADOSTITS et al., 2002).

As principais rotas de transmissão são por ingestão de água e alimentos contaminados, ou por ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados por procedimentos de manejo, como a tosquia ou a castração, ou por fatores naturais, como por arbustos pontiagudos e espinhos (ALVES & PINHEIRO, 1997). A entrada da bactéria no organismo é facilitada por lesões na pele; entretanto, pode penetrar até mesmo pela pele intacta (WILLIAMSON, 2001).

3.2.3 Patogenia e Imunologia

C. pseudotuberculosis é um parasita intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se multiplicar em fagócitos. A virulência da bactéria está relacionada

aos lipídeos da parede e a exotoxina (fosfolipase D), responsáveis pela sobrevivência e multiplicação dentro do hospedeiro (QUINN et al., 2005).

Após a penetração no hospedeiro, o microrganismo é capturado localmente por células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos. Após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo; porém, a bactéria continua a se multiplicar no interior dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos macrófagos. A incapacidade de eliminação da bactéria pelos fagócitos ocorre pela presença da camada lipídica bacteriana e à resistência da bactéria ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos (BOGDAN et al., 1997; SONGER et al., 2005). Uma vez no interior dos linfonodos, iniciam-se ciclos de infecção, replicação do patógeno e lise das células fagocíticas, resultando na formação de lesões necróticas e colonização dos linfonodos (JONES et al., 2000). Os abscessos formados geralmente são fibrosos, encapsulados e com uma elevada taxa de microrganismos viáveis no conteúdo interno, que ao se romperem podem liberar uma elevada carga bacteriana, podendo contaminar o ambiente e, conseqüentemente, o restante do rebanho (JONES et al., 2000).

Algumas vezes ocorre disseminação da bactéria pelo sangue ou pelo sistema linfático, o que caracteriza a forma visceral, levando a lesões similares em abscessos internos, e pode acometer órgãos, principalmente linfonodos mediastínicos e pulmões. A formação de abscessos pode ocorrer também em glândulas mamárias, rins, fígado, coração, cérebro e medula espinhal (FONTAINE et al., 2006). Essa disseminação envolve a ação de outro determinante de virulência, a exotoxina fosfolipase D (AIELLO et al., 1998; SONGER et al., 2005).

Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre a formação de granulomas, os quais se iniciam com o aparecimento de células epitelióides que, posteriormente, são substituídas por necrose caseosa. Esse processo é crônico e se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia, o qual é caracterizado por uma massa esférica laminada (JONES et al., 2000).

A formação de granulomas é um processo dependente da imunidade adaptativa que, nesse caso, é complexa e envolve tanto uma resposta imune humoral quanto celular (DELVES & ROITT, 2000). As células responsáveis pela resposta humoral são os linfócitos B, que respondem aos antígenos estranhos, pelo

desenvolvimento de anticorpos, enquanto que os linfócitos T são mediadores da imunidade celular (EL-ENBAAWY et al., 2005; PAULE et al., 2003).

Pépin e colaboradores (1994) observaram que há mais linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação em comparação com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados.

Diversas citocinas são expressas durante a infecção experimental, entre as quais se destacam IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes, e de TNF- α e INF- γ no sítio de inoculação. Estas citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune celular, sendo que o IFN- γ possui grande importância na ativação de macrófagos, os quais são responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (PÉPIN et al., 1997).

Levando em consideração os níveis de expressão de citocinas, Pépin e colaboradores (1997) sugeriram que a formação do granuloma pode estar diretamente relacionada aos dois tipos de resposta Th1 e Th2. E ainda, que citocinas inflamatórias, que apresentam níveis elevados no início da formação do granuloma, como IFN- γ , IL-2, IL-4, MCP-1 e TNF- α , são importantes fatores na diminuição da disseminação da bactéria.

O papel da resposta imune humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado em ensaios de imunização passiva, nos quais a administração de soros antitoxina e antibacteriana protegeram camundongos desafiados com a bactéria (PAULE et al., 2003).

3.2.4 Sinais Clínicos

A LC se manifesta de duas formas: superficial e visceral, dependendo do local e da extensão das lesões. Os linfonodos acometidos normalmente apresentam um aumento de volume, que possivelmente drenam material com uma grande quantidade de pus, coloração branca ou esverdeada, de consistência pastosa, contendo muitos microrganismos viáveis (MCKEAN et al., 2007).

No caso da forma visceral da doença, é possível observar perda de peso crônica dos animais. Pode ocorrer também infertilidade, nascimento de um número

menor de crias, diminuição da produção de leite, baixo desenvolvimento e diminuição da produção de lã. O microrganismo pode atingir o sistema nervoso central ou ainda os linfonodos inguinais e a glândula mamária, ocasionando sintomas neurológicos e mastites (DIFFAY et al., 2002; WILLIAMSON, 2001).

As lesões da LC se desenvolvem de forma lenta, resultando em uma doença crônica que permanece muitas vezes por toda a vida do animal. Bactérias viáveis podem ser recuperadas de abscessos vários anos após a infecção inicial. Além disso, pode ocorrer reativação da doença, com o desenvolvimento de lesões em novos sítios após um período considerável de cura aparente (BAIRD & FONTAINE, 2007; MCKEAN et al., 2007a; PEPIN et al., 1994).

3.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é o mais utilizado pelos produtores e veterinários, e é realizado principalmente pela observação macroscópica dos abscessos superficiais externos. O teste definitivo, considerado padrão-ouro, é realizado a partir do isolamento da bactéria diretamente do material caseoso drenado dos linfonodos acometidos e cultivo bacteriológico, seguido por testes bioquímicos (RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001). O teste bioquímico estabelecido para a identificação de bactérias corineformes é o sistema *API Coryne* (*API-bioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France*). Esse método consiste em 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 horas. O sistema contém substratos que permitem avaliar 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, α -glucosidade, N-acetilglucosaminidase, β -glucuronidase, nitrato redutase, esculina hidrolase e urease) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glicose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio).

Mesmo esse diagnóstico sendo eficiente, se torna muito dispendioso para os produtores, além de ser pouco sensível por ser incapaz de detectar animais de fase assintomática. Assim, outros testes têm sido desenvolvidos para superar o problema do diagnóstico subclínico, mas a maioria não possui sensibilidade e especificidade suficientes. Alguns diagnósticos sorológicos, como teste de imunodifusão em gel (BURRELL, 1980), microaglutinação (MENZIES; MUCKLE, 1989), *Western blot* (PAULE et al., 2004; TER LAAK et al., 1992), fixação do complemento (SHIGIDI et

al., 1979) e vários ELISAs (DERCKSEN et al., 2000; MENZIES et al., 1994) já foram utilizados. Muitos dos testes para sorodiagnóstico baseados nos preparos de células totais mortas de *C. pseudotuberculosis*, extratos de parede ou toxóides do filtrado de cultivo bacteriano possuem uma baixa especificidade e frequentemente geram resultados falso-positivos (BROWN et al., 1987; MENZIES; MUCKLE, 1989).

3.2.6 Tratamento

O tratamento da LC pode ser realizado através da utilização de antibióticos e pela drenagem e extirpação de abscessos em linfonodos superficiais. Entretanto, essas não são medidas consideradas eficientes. A primeira não é recomendada devido à demora da terapia que pode levar semanas ou até meses, e por possuir custos elevados. Além do mais, apesar da bactéria ser sensível a vários tipos de antibióticos *in vitro*, esses não são capazes de penetrar nas espessas cápsulas dos abscessos, tornando a terapia ineficaz; e há capacidade de restar resíduos no leite e na carne (AIELLO et al., 1998; OLSON et al., 2002). Enquanto que na segunda, a incisão cirúrgica dos abscessos periféricos deve ser realizado antes que esses se rompam espontaneamente, e realizada uma antisepsia rigorosa com iodo 10%. Além disso, é impossível eliminar todas as bactérias presentes nos linfonodos superficiais, e quando esses são localizados em órgãos internos, o tratamento por esse método não se aplica (ALVES E PINHEIRO, 1997). Além da ineficiência, esse tratamento pode acarretar na contaminação do ambiente com o patógeno, e esse contaminar todo o restante do rebanho (PIONTKOWSKI E SHIVERS, 1998).

3.2.7 Profilaxia

Como não existe um tratamento eficaz contra essa enfermidade, medidas profiláticas são necessárias para o controle da LC. A identificação dos animais infectados e sua remoção do restante do rebanho são métodos mais eficientes de controle da LC (BINNS et al., 2002). Além disso, procedimentos de manejo como esterilização de instrumentos de uso comunitário, limpeza das instalações (galpões, troncos de tosquia e baias de contenção), inspeção periódica de todos os animais do

rebanho, manipulação dos animais sempre iniciada pelos mais jovens e o tratamento de feridas na pele com o uso de agentes bactericidas, são medidas que podem reduzir a incidência e a disseminação da doença nos rebanhos de caprinos e ovinos (DORELLA et al., 2006; WILLIAMSON, 2001).

Dessa forma, o controle da LC deve ser baseado em medidas preventivas que impeçam a entrada e a disseminação do patógeno nos rebanhos. A utilização de vacinas foi comprovada nos últimos 120 anos como sendo o método mais eficiente e efetivo no controle de doenças infecciosas (DORELLA et al., 2009). Por conseguinte, pesquisas que buscam a melhoria na eficácia das formulações vacinais devem ser prioridade para o controle da LC (DORELLA et al., 2009).

3.2.8 Vacinas

Ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra *C. pseudotuberculosis*. A maioria das vacinas disponíveis comercialmente se baseiam em sobrenadantes de cultura celular inativados combinados com antígenos de outros patógenos, como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi* e *Clostridium chavoei*. Estas vacinas possuem a exotoxina fosfolipase D inativada, na forma de toxóide. Contudo, elas não possuem uma eficácia satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (PIONTKOWSKI E SHIVVERS, 1998; STANDFORD et al., 1998; WILLIAMSON, 2001).

No Brasil, uma vacina viva atenuada produzida a partir da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, foi licenciada em 2000 e vem sendo industrializada, em versão líquida e liofilizada, pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. Esta vacina se baseia em uma linhagem isolada no ano de 1971, e apresenta naturalmente uma baixa virulência. Porém, esta vacina não vem apresentando a mesma eficácia entre ovinos e caprinos em testes a campo, sendo bastante variável o nível de proteção obtida (PATON et al., 2003).

Assim, a busca por uma vacina ideal contra a LC, que forneça uma proteção de longa duração, sem provocar reações adversas, e que permita a diferenciação entre animais vacinados e infectados, tem sido uma prioridade (DORELLA et al., 2009). Para isso, diferentes estratégias vacinais têm sido testadas, como o uso de bactérias atenuadas e mortas (BROGDEN et al., 1990; LEAMASTER et al., 1987;

SIMMONS et al., 1998), frações contendo antígenos da parede bacteriana (BRAGA, 2007), sobrenadantes da cultura bacteriana (EGGLETON et al., 1991; MOORE et al., 2000; TACHEDJIAN et al., 1995), vacinas de DNA (CHAPLIN et al., 1999) e uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (BRAGA, 2007; EL-ENBAAWY et al., 2005). Essas preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais, e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

Recentemente, Dorella e colaboradores (2006a) identificaram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis* por meio de mutagênese aleatória, utilizando o sistema de transposição baseado no TnFuz. Esse sistema de transposição foi útil para a identificação de genes que codificam proteínas exportadas, como subunidades fimbriais e adesinas, as quais estão provavelmente envolvidas diretamente com os processos de entrada e sobrevivência da bactéria nas células hospedeiras, contribuindo para a sua virulência (DORELLA et al., 2006b).

3.2.8.1 Gene *cp1002_0126a*

Santos e colaboradores (2012) identificaram vários alvos a partir de sequenciamento e de análise proteômica, dentre eles o gene *cp1002_0126a* que codifica para uma provável proteína secretada, sendo descrita como potencialmente antigênica por ser reativa no estudo de exosecretoma de *C. pseudotuberculosis*. Dessa forma, é considerado um alvo promissor no desenvolvimento de vacinas recombinantes. Análises com o programa *SurfG plus* demonstraram que esse gene possui motivos de exportação conservados (SANTOS et al., 2012).

3.3 *Mycobacterium bovis* BCG

O Bacilo Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa viva atenuada da bactéria *Mycobacterium bovis*, utilizada principalmente como vacina contra a tuberculose (BENEVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005). Foi desenvolvido em 1921 por Albert Calmette e Camille Guérin, e sofreu sucessivos subcultivos, o que resultou na atenuação da cepa original. A utilização dessa vacina em humanos, bem como sua

produção em larga escala, ocorreu em 1924, no Instituto Pasteur de Lille, na França (BENEVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005).

As vacinas recombinantes vetorizadas podem conferir níveis de proteção satisfatórios. Dentre os diversos tipos existentes, *Mycobacterium bovis* BCG possui destaque, já que se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias enfermidades (BASTOS et al., 2009; DENG et al., 2014; KAUFMANN & GENGENBACHER, 2012; RIZZI et al., 2012).

O interesse no *M. bovis* BCG tem crescido pelo desenvolvimento de diferentes sistemas genéticos para expressão de antígenos em micobactérias. Dessa forma, antígenos de bactérias, parasitas e vírus têm sido expressos em *M. bovis* BCG, e essas cepas de BCG recombinantes produzem resposta imune humoral e celular contra antígenos heterólogos (STOVER et al., 1991). O sucesso do *M. bovis* BCG como agente imunoterápico tem promovido o desenvolvimento de pesquisas que buscam maneiras de manter ou melhorar sua eficácia terapêutica, reduzindo o perfil de efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2010).

Em um estudo com *M. bovis* BCG expressando o envelope peptídico V3 de HIV-1 foi testado como vacina oral em porcos da Índia. As células mononucleares do sangue periférico dos animais imunizados apresentaram resposta proliferativa significativa. Curiosamente, o peptídeo de HIV hipersensitivo tardio foi detectado 1 ano e meio após a imunização (KAWAHARA et al., 2002).

Méderlé e colaboradores (2003) imunizaram macacos com uma única inoculação de 3 sequências de BCG recombinante expressando os genes SIVmac251 nef, gag, e env. Os animais receberam doses auxiliares retais e orais dos rBCGs. Os autores mostraram que as doses auxiliares nas mucosas aumentaram a produção de IFN- γ e induziu a produção de IgA de mucosa.

M. bovis BCG, apresenta propriedades adjuvantes, não é afetado pelos anticorpos maternos, uma única dose pode conferir uma longa resposta imune, é estável e seguro, pode ser administrado oralmente e tem um baixo custo de produção quando comparado a outras vacinas vivas, tornando-se um atrativo vetor vivo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes e multivalentes (BASTOS et al., 2009).

O vetor pUS977 transporta o promotor pAN de *M. paratuberculosis*, caracterizado e isolado por Murray e colaboradores (1992). O vetor pUS2000 contém o promotor do gene 18kDa de *M. leprae* (DELLAGOSTIN et al., 1995). Os

vetores pUS977 e pUS2000 possuem uma estabilidade superior aos que contém o promotor hsp60 (MEDEIROS et al., 2002; MICHELON et al., 2006).

4 Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, no Centro de Desenvolvimento Tecnológico, da Universidade Federal de Pelotas.

4.1 Cepas e condições de cultivo

A bactéria *Escherichia coli* foi cultivada em meio LB (Luria-Bertani) líquido ou sólido (com 1,5% de Ágar) e, quando necessário, o antibiótico canamicina (50mg/mL) foi adicionado ao meio de cultivo. A cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur foi cultivada em meio 7H9 suplementado com 10% de OADC (*Oleic Acid Albumin Dextrose Complex*), 0,2% de Glicerol 10% e 0,05% de *Tween* 80 ou em meio sólido 7H10, contendo 10% de OADC e 0,2% de Glicerol 10%, quando necessário foi utilizado o antibiótico canamicina (25mg/mL).

4.2 Amplificação do gene *cp0126a* de *C. pseudotuberculosis*

A amplificação do gene *cp0126a* foi realizada através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) utilizando 100ng de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, 25µL de Master Mix, 22µL de H₂O Milli-Q, 10µM do *primer* F (5' - CCA TCT AGA CAT GCA CTT CAA AAC C - 3') e 10µM do *primer* R (5' - CGC AAG CTT TTA TAG GAT GTT A - 3'), para um volume final de 50µL. A PCR foi realizada inicialmente com um ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C, repetidos por 32 vezes, após uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Em seguida, o produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmar a amplificação do gene. Posteriormente o gene *cp0126a* foi purificado através do *Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Health Care), seguindo as recomendações do fabricante.

4.3 Ligação do gene *cp0126a* aos vetores pUS977 e pUS2000

A digestão do *amplicon* do gene *cp0126a* e dos vetores de expressão pUS977 e pUS2000 foi realizada utilizando 1U das enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*, que geram extremidades coesivas que podem ser ligadas pela T4 DNA ligase (*Invitrogen*), em termociclador (*T100™ Thermal Cycler*) por 2 horas a 37°C. Em seguida, foi realizada a purificação utilizando o *Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Health Care)*, seguindo as recomendações do fabricante, e uma eletroforese em gel de agarose 1%. A ligação do gene *cp0126a* aos plasmídeos pUS977 e pUS2000 foi realizada a temperatura ambiente durante 2 horas e 30 minutos com 200ng dos plasmídeos e 600ng do gene *cp0126a* com 1U da enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*).

4.4 Preparo das células competentes de *E. coli*

Uma colônia de *E. coli* TOP10 foi cultivada em 25mL de LB líquido a 37°C, sob agitação, *overnight*. Este pré-inóculo foi utilizado para inocular 500mL de meio LB líquido, e a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação, até atingir uma DO_{600nm} entre 0,5 e 0,6. A cultura foi então mantida em banho de gelo por no mínimo 20 minutos e, em seguida, centrifugada a 4500rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 250mL de água Milli-Q. A centrifugação foi repetida sob as mesmas condições. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 125mL de glicerol 10%. A centrifugação foi repetida novamente, e o *pellet* foi suspenso em 1mL de glicerol 10%. A suspensão bacteriana foi distribuída em alíquotas de 100μL e mantidas a -80°C até o momento do uso.

4.5 Transformação por eletroporação em *E. coli*

Um volume de 1μL de cada reação de ligação foi utilizado para transformar 100μL de células eletrocompetentes, utilizando o eletroporador *Gene Pulser (BioRad)*. Os parâmetros utilizados para eletroporação foram: 2,5kV, 25μF e 200Ω.

Após a eletroporação, a mistura foi transferida para um *eppendorf* contendo 500µL de LB líquido e incubada a 37°C, sob agitação, por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as células foram plaqueadas em LB sólido, contendo canamicina, e incubadas a 37°C por 16 horas.

4.6 Seleção dos clones recombinantes

As colônias recombinantes foram selecionadas através de lise rápida por fenol-clorofórmio (v/v) e posteriormente submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1%. As colônias selecionadas foram cultivadas em 5mL de meio LB líquido com canamicina. A extração dos possíveis plasmídeos recombinantes foi realizada utilizando o *Kit Illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Health Care)*. Posteriormente, foi realizada a caracterização dos clones recombinantes por digestão enzimática com as enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*. Os clones recombinantes foram denominados de pUS977/*cp0126a* e pUS2000/*cp0126a*.

4.7 Produção do soro policlonal

Dois camundongos isogênicos BALB/c, com seis semanas de idade, foram inoculados intraperitonealmente com 100µg da proteína recombinante rCP0126a purificada, previamente expressa em *E. coli*, adicionada ao adjuvante saponina (7,5µg/dose). Doses de reforço foram administradas 21 dias após a primeira imunização. Amostras de sangue periférico foram coletadas através de punção do plexo retro orbital nos dias 0 e 42 pós-inoculação. No dia 42 pós-inoculação, os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico e o sangue periférico foi coletado por punção cardíaca para posterior obtenção do soro hiperimune. O experimento possui aprovação do Comitê de Ética sob o número 2422.

4.8 Transformação dos clones recombinantes em BCG Pasteur

M. bovis BCG Pasteur foi cultivado em 45mL de meio 7H9 suplementado com 5mL de OADC e 125 μ L de *Tween* 80. A cultura foi incubada a 37°C por aproximadamente 5 dias.

Após o período de crescimento o cultivo de *M. bovis* BCG Pasteur foi centrifugado a 14000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado em 10mL H₂O apirogênica, e a centrifugação foi repetida sob as mesmas condições. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* suspenso em 5mL de glicerol 10%. A centrifugação foi repetida novamente, e o *pellet* eluído em 100 μ L de glicerol 10%. As células foram utilizadas para a eletroporação.

Assim, 1 μ L dos clones recombinantes (pUS977/*cp0126a* e pUS2000/*cp0126a*) foram utilizados para transformar 100 μ L de células competentes de *M. bovis* BCG utilizando o eletroporador *Gene Pulser (BioRad)*. Os parâmetros utilizados para eletroporação foram: 2,5kV, 25 μ F e 800 Ω . As células foram recuperadas em 1mL de meio (7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,05% de *Tween* 80) a 37°C, sob agitação, durante 24 horas. Após esse período, o cultivo foi transferido para placas de Petri contendo 15mL de meio 7H10, 1,5mL de OADC e 7,5mg/mL de canamicina. As placas foram deixadas em estufa a 37°C por aproximadamente 21 dias.

4.8.1 Preparo das amostras para *Western blot*

Uma colônia de cada clone recombinante (*M. bovis* BCG/pUS977/*cp0126a* e *M. bovis* BCG/pUS2000/*cp0126a* e de *M. bovis* BCG Pasteur (controle negativo) foram cultivadas em 9mL de meio 7H9, 1mL de OADC, 25 μ L de *Tween* 80 e 25mg/mL de canamicina – no caso do *M. bovis* BCG Pasteur, não foi utilizado canamicina. Os cultivos foram mantidos a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 7 dias. A seguir, as culturas foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos e suspendidas em 1mL de Tris HCl 50mM pH 7,4. Pérolas de vidro foram adicionadas, e o conteúdo foi submetido a ribolização (*Hybaid RiboLyser Homogenizer*) durante 6 ciclos por 45 segundos cada. As amostras foram congeladas a –20°C para posterior utilização.

4.9 Avaliação da expressão da proteína CP0126a por *Western blot*

Uma quantidade de 40µL de cada amostra foi misturada ao tampão de amostra SDS 5x, para um volume final de 50µL. Em seguida, as misturas foram aquecidas a 100°C por 10 minutos para a desnaturação das proteínas. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel 12% SDS-PAGE a 120V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após, um dos géis foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*; e o outro foi utilizado para realização do *Western blot*.

As proteínas presentes nas amostras do gel SDS-PAGE (12%) foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (*Nitrocellulose Blotting Membrane – GE Health Care*), a 140V e amperagem de 400 por 1 hora e 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-leite em pó 5%, por 16 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (0,05% *Tween*) durante 30 segundos cada e, posteriormente, submetida a leve agitação por 1 hora com soro policlonal na diluição 1:80 em PBS-T 0,05%. O processo de lavagem foi repetido, nas mesmas condições, e a membrana foi novamente submetida a leve agitação por 1 hora com anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:4000 em PBS-T. Por fim, a membrana foi lavada cinco vezes, durante 1 minuto cada, com PBS-T e revelado por quimioluminescência, utilizando o *Kit ECL (Thermo Scientific)*.

5. Resultados

5.1 Obtenção do gene *cp0126a*

O gene *cp0126a* foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando o DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*, cepa 1002. Na figura abaixo é possível visualizar a amplificação do gene de interesse no tamanho esperado de 684pb (Figura 1).

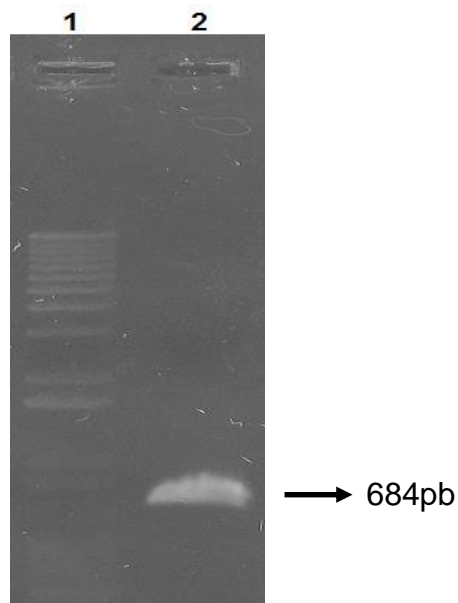


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR. (1): Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). (2): Gene *cp0126a*.

5.2 Caracterização dos clones recombinantes

O gene *cp0126a* foi ligado aos vetores pUS977 e pUS2000. Para a confirmação dos clones recombinantes, esses foram caracterizados por digestão enzimática (Figura 2).

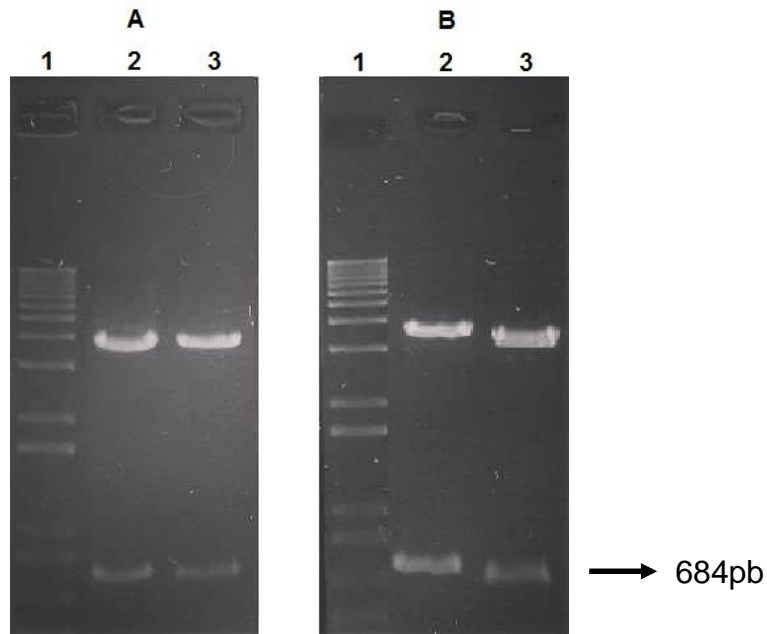


Figura 2: Caracterização dos clones recombinantes por digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*. (A): 1- Marcador de peso molecular 1Kb *plus* (*Invitrogen*). 2- Clone 1 da pUS977/*cp0126a*. 3- Clone 2 da pUS977/*cp0126a*. (B): 1- Marcador de peso molecular 1Kb *plus* (*Invitrogen*). 2- Clone 1 da pUS2000/*cp0126a*. 3- Clone 2 da pUS2000/*cp0126a*.

Na figura 2A é possível observar dois fragmentos, os fragmentos acima representam os vetores pUS977 e os fragmentos abaixo são referentes ao gene *cp0126a* no tamanho esperado de 684pb após a caracterização por digestão enzimática. Enquanto que na figura 2B, também é possível observar dois fragmentos, sendo os fragmentos acima referentes ao vetor pUS2000 e os fragmentos abaixo referente ao gene *cp0126a* também no tamanho de 684pb. Após a confirmação dos vetores recombinantes, esses foram transformados em *M. bovis* BCG Pasteur.

5.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante em *M. bovis* BCG Pasteur

A avaliação da expressão da proteína CP0126a em *M. bovis* BCG foi realizada por meio de SDS-PAGE, e por *Western blot*. Na figura 3 não é possível visualizar a expressão da proteína CP0126a através do SDS-PAGE.

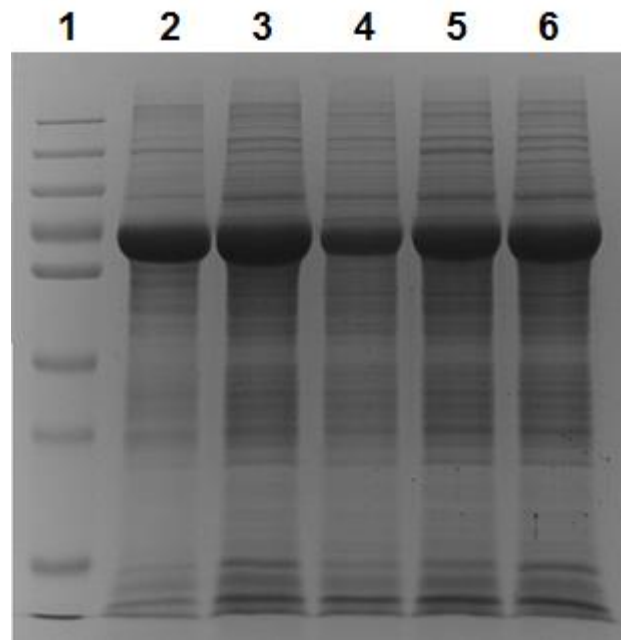


Figura 3: SDS-PAGE para avaliação da expressão da proteína recombinante. (1): Marcador de peso molecular para proteína pré-corado (*Thermo Scientific*). (2): *M. bovis* BCG Pasteur não transformado (controle negativo). (3): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 1 da pUS2000/CP0126a. (4): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 2 da pUS2000/CP0126a. (5): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 1 da pUS977/CP0126a. (6): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 2 da pUS977/CP0126a.

A proteína CP0126a foi expressa em *M. bovis* BCG com peso molecular aproximado de 25kDa sob controle dos dois promotores pAN (pUS977), e 18kDa (pUS2000) quando comparado a *M. bovis* BCG não transformado (controle negativo) (Figura 4).

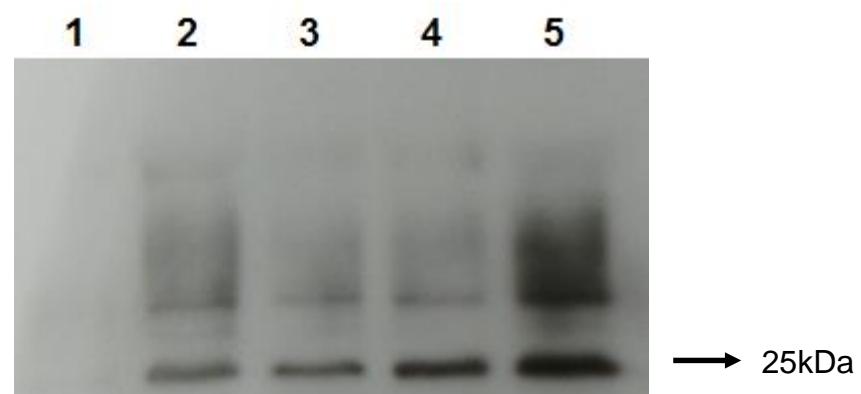


Figura 4: *Western blot* avaliando a expressão da proteína CP0126a em *M. bovis* BCG Pasteur utilizando soro policlonal anti-CP0126a. (1): *M. bovis* BCG Pasteur não transformado (controle negativo). (2): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 1 da pUS2000/CP0126a. (3): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 2 da pUS2000/CP0126a. (4): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 1 da pUS977/CP0126a. (5): *M. bovis* BCG Pasteur transformado com o clone 2 da pUS977/CP0126a.

6 Discussão

No Brasil a população de caprinos e ovinos tem aumentado a cada ano, atualmente o rebanho nacional é de aproximadamente 26,4 milhões de cabeças, sendo a maioria localizado na região nordeste do país (IBGE, 2014; RIBEIRO et al., 2001). Contudo, a ovinocaprinocultura apresenta algumas enfermidades de importância econômica, dentre elas se destaca a LC, a qual é responsável por causar prejuízos para a indústria de derivados, como perda do valor comercial das peles e redução na produção de leite; além de afetar a cultura de subsistência básica para o pequeno produtor (DORELLA et al., 2009a; MEYER et al., 2010; WILLIAMSON, 2001).

Devido a ineficácia dos tratamentos existentes, a imunoprofilaxia se torna a medida preventiva ideal, com melhor custo-benefício (DORELLA et al., 2006a). Até o momento não há uma vacina que forneça uma proteção de longa duração, que não provoque reações adversas, e que permita a diferenciação entre animais vacinados e infectados (DORELLA et al., 2009). Diversas estratégias têm sido testadas no combate da LC, como vacinas de DNA (COSTA et al., 2011), vacinas de subunidade recombinantes (FONTAINE et al., 2006), uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (EL-ENBAAWY et al., 2004) e vacinas compostas de bactérias atenuadas e inativadas (SIMMONS et al., 1998).

Este trabalho avaliou a proteína CP0126a de *C. pseudotuberculosis*, caracterizada como potencialmente promissora por análises de bioinformática (SANTOS et al., 2012), e a expressão em *M. bovis* BCG Pasteur nos diferentes vetores pUS977 e pUS2000. Dessa forma, foi possível analisar a expressão da proteína em ambos os vetores, a fim de avaliar e comparar a expressão dessa proteína, visando a obtenção de uma vacina recombinante vetorizada para LC.

O vetor pUS977 contém o promotor pAN de *M. paratuberculosis* (MURRAY et al., 1992), enquanto o vetor pUS2000 contém o promotor do gene 18kDa de *M. leprae* (DELLAGOSTIN et al., 1995). Tanto o pUS977 quanto o pUS2000 possuem uma estabilidade superior a outros vetores que possuem o promotor hsp60, por exemplo. (MEDEIROS et al., 2002; MICHELON et al., 2006).

A utilização de *M. bovis* BCG possui destaque dentre as vacinas vetorizadas, pois apresenta similaridades antigênicas com *C. pseudotuberculosis* (GAO et al., 2006). É um vetor vacinal que permite a expressão de antígenos heterólogos, e já

conferiu proteção contra várias doenças, entre elas a tuberculose (BASTOS et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Um trabalho realizado por Selim e colaboradores (2012) utilizando o BCG Pasteur, como adjuvante, associado com a fosfolipase D recombinante conferiu uma taxa de proteção de 66% contra LC.

Santos e colaboradores (2012) identificaram vários alvos através de uma análise exoproteoma do pangenoma de cinco cepas de *C. pseudotuberculosis* (1002, C231, I19, FRC41 e PAT10) e também por uma identificação de epítomos MHC, dentre eles o gene *cp1002_0126a* que codifica para uma provável proteína secretada, sendo esta considerada um alvo promissor no desenvolvimento de vacinas recombinantes *in silico*.

Alguns estudos já avaliaram vacinas recombinantes. Pinho e colaboradores (2009) utilizaram a proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*, na sua forma recombinante e como vacina associada ao adjuvante hidróxido de alumínio em camundongos. No entanto, não foi observada a proteção dos animais quando desafiados com a cepa virulenta.

Já Costa e colaboradores (2011) construíram e testaram em camundongos uma vacina de DNA contra *C. pseudotuberculosis* onde utilizaram o gene *Hsp60* como produtor de antígeno. Os animais desenvolveram resposta humoral significativa, porém não suficiente para proteção contra o desafio. Portanto, há importância de novos estudos para a obtenção de uma vacina que possa conferir uma proteção satisfatória.

No presente estudo, demonstrou-se o potencial do *M. bovis* BCG Pasteur em expressar a proteína CP0126a de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados obtidos são promissores e, novos experimentos serão realizados para avaliar a proteção conferida pelas vacinas recombinantes vetorizadas construídas em camundongos.

7 Conclusão

Neste trabalho, foi possível demonstrar que a proteína CP0126a de *C. pseudotuberculosis* foi expressa com sucesso em *M. bovis* BCG, sob controle dos promotores pAN e 18kDa. O próximo passo será o estudo em modelo animal, onde espera-se avaliar a obtenção de uma vacina promissora contra a LC.

Referências

AIELLO, S. E. et al. Parasitic Skin Diseases. **AIELLO, SE The merck veterinary manual. Philadelphia: National Publishing**, p. 650-653, 1998.

AL-RAWASHDEH, O. F.; AL-QUDAH, K. M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 47, n. 4, p. 287-293, 2000.

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

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa: o estado da arte**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2007.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do sistema tegumentar. **PUGH, DG Clínica de ovinos e caprinos**, v. 1, p. 221-249, 2005.

ANDRADE, P.M.; CHADE, D.C.; BORRA, R.C.; NASCIMENTO, I.P.; VILLANOVA, F.E.; LEITE, L.C.; ANDRADE, E.; SROUGI, M. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urol.Oncol.**, v. 28, p. 520-525, 2010.

ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi–visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive veterinary medicine**, v. 59, n. 1, p. 67-81, 2003.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 12, p. 1251, 1977.

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, 2007.

BASTOS, R. G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BENEVOLO-DE-ANDRADE, T.C.; MONTEIRO-MAIA, R.; COSGROVE, C.; CASTELLO-BRANCO, L.R. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 459-465, 2005.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691-692, 1971.

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

BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C. F.; ELLIS, J. A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 3, p. 299-310, 1997.

BRAGA, W. U. Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. **Veterinary microbiology**, v. 119, n. 2, p. 297-303, 2007.

BROGDEN, K. A. et al. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. **American journal of veterinary research**, v. 51, n. 2, p. 200-202, 1990.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Vet. Bull**, v. 57, n. 1, p. 1-12, 1987.

BURRELL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research in veterinary science**, v. 28, n. 2, p. 234-237, 1980.

BUXTON, A.; FRASER, G. *Corynebacterium*. **Animal Microbiology**. Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, p. 177-183, 1977.

CASTRO, T. L. P. **Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

CHAPLIN, P. J. et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and immunity**, v. 67, n. 12, p. 6434-6438, 1999.

COETZER, J. A. W. et al. **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa: Volume 1**. Oxford University Press Southern Africa, 1994.

CORDEIRO, P. R. C. O desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. **Rev Cons Fed Med Vet**, v. 4, n. 13, p. 28-30, 1998.

COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 243, 2011.

D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genet Mol Res**, v. 7, p. 252-260, 2008.

D'AFONSECA, V. et al. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiological research**, v. 165, n. 4, p. 312-320, 2010.

DE SÁ GUIMARÃES, A. et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **IIOAB Journal**, v. 2, n. 2, 2011.

DELVES, P. J.; ROITT, I. The immune system: first of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DENG, Y. H.; HE, H. Y.; ZHANG, B. S. Evaluation of protective efficacy conferred by a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a fusion protein of Ag85A-ESAT-6. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2014.

DERCKSEN, D. P. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2000.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. **Microbiology**, v. 141, n. 8, p. 1785-1792, 1995.

DIFFAY, B. C. et al. Handling and examination of sheep and goats. **Sheep and goat Medicine**, v. 1, p. 1-17, 2002.

DORELLA, F. A.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais**, 2009.

DORELLA, F. A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. 2009.

DORELLA, F. A. et al. *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7368-7372, 2006b.

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

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian veterinary journal**, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991.

EL-ENBAAWY, M. I.; SAAD, M. M.; SELIM, S. A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **The Egyptian journal of immunology/Egyptian Association of Immunologists**, v. 12, n. 2, p. 13-19, 2004.

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33, p. 5986-5996, 2006.

GAO, B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 1, p. 69-91, 2006.

GASKIN, J. M. e GUSS, S. B. Caseous lymphadenitis and pinkeye. In: *Goat handbook*. 1992

GUIMARÃES, A. S. et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1, p. 86-91, 2009.

HOLT, J. G. et al. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. **Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore**, p. 593, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2013-2014.

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default_xls_brasil.shtm

>. Acesso em 26 out. 2015.

IRWIN, MICHAEL R.; KNIGHT, HUMPHREY D. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. **Infection and immunity**, v. 12, n. 5, p. 1098-1103, 1975.

JOLLY, R. D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **New Zealand veterinary journal**, v. 13, n. 6, p. 141-147, 1965.

JONES T.C., HUNT R.D. & KING N.W. **Patologia veterinária**. Sexta edição. Manole, São Paulo. 1424 p. 2000.

JONES, D. Irregular, non-sporing Gram-positive rods. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 2, p. 1261-1434, 1986.

KAWAHARA, Mamoru et al. Oral recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 3, p. 326-331, 2002.

KAUFMANN, S. H.; GENGENBACHER, M. Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 900-907, 2012.

KIMBERLING, C. V. **Caseous Lymphadenitis**. In: Jensen and Swift's Diseases of Sheep. 3. ed. Lea e Febiger. p. 374-377, 1988.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

LEAMASTER, B. R. et al. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. **American journal of veterinary research**, v. 48, n. 5, p. 869-872, 1987.

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

MEDEIROS, M. A. et al. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. **Microbiology**, v. 148, n. 7, p. 1999-2009, 2002.

MÉDERLÉ, I. et al. Mucosal administration of three recombinant *Mycobacterium bovis* BCG-SIVmac251 strains to cynomolgus macaques induces rectal IgAs and boosts systemic cellular immune responses that are primed by intradermal vaccination. **Vaccine**, v. 21, n. 27, p. 4153-4166, 2003.

MENZIES, P. I. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**, v. 13, n. 2, p. 193-198, 1994.

MENZIES, P. 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. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 313, 1989.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. The genus *corynebacterium*. **Veterinary bacteriology and virology, The Iowa State University Press, Iowa**, p. 425-440, 1967.

MEYER, R. et al. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2010.

MICHELON, André et al. Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. **Vaccine**, v. 24, n. 37, p. 6332-6339, 2006.

MOORE, R. J. et al. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. **Vaccine**, v. 18, n. 5, p. 487-497, 1999.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 206, 1982.

MURRAY, A.; WINTER, N.; LAGRANDERIE, M. other authors (1992). Expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. **Mol Microbiol**, v. 6, p. 3331-3342, 7.

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86, 2002.

PATON, M. W. et al. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian veterinary journal**, v. 71, n. 2, p. 47-49, 1994.

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

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 96, n. 3, p. 129-139, 2003.

PAULE, B. J. A. et al. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. ciênc. méd. biol**, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2004.

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

PEPIN, M. et al. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 5, p. 666-670, 1994.

PEPIN, M. et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Veterinary research**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 1997.

PINHO, J. M. R. et al. Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. **Open Vet Sci J**, v. 3, p. 22-27, 2009.

PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 11, p. 1765-1768, 1998.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed, 2005.

QUINTANS, L. J. Estudo de mercado e de localização, Usina de Desidratação de leite de cabras. **Microrregião homogênea do Cariri Ocidental. Plano de Desenvolvimento Local Integrado**. João Pessoa, p. 104, 1995.

RADOSTITS, O. M. et al. Doenças causadas por Bactérias. **Clínica veterinária—Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, v. 9, p. 653-656, 2002.

RIBEIRO, M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq Inst Biol**, v. 68, p. 23-28, 2001.

RIZZI, C. et al. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51396, 2012.

SANTOS, A. R. et al. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC genomics**, v. 13, n. Suppl 5, p. S6, 2012.

SCOTT, P. R. The Skin. In: SCOTT, P.R. **Sheep Medicine**. London: Mason Pub, p. 246-248, 2007.

SELIM, S. A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 48, n. 4, p. 241-258, 2001.

SELIM, S. A. et al. Synergistic haemolytic activity and its correlation to phospholipase D productivity by *Corynebacterium pseudotuberculosis* Egyptian isolates from sheep and buffaloes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 552-559, 2012.

SHIGIDI, M. T. A. comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **British veterinary journal**, 1979.

SIMMONS, C. P. et al. Vaccine Potential of Attenuated Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

SONGER, J. G. et al. **Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease**. Elsevier Health Sciences, 2004.

STANFORD, K. et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 38, 1998.

STOBER, C. K.; DE LC, V.; FUERST, T. R.; BURLEIN, J. E.; BENSON, L. A.; BENNETT, L. T. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, v. 351, p. 456-60, 1991.

TACHEDJIAN, M. et al. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine**, v. 13, n. 18, p. 1785-1792, 1995.

TER LAAK, E. A. et al. 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, 1992.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-71, vii, 2001.

YERUHAM, I. et al. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. **Veterinary dermatology**, v. 15, n. 5, p. 315-320, 2004.