

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa

Gabriel Brenner

Pelotas, 2019

Gabriel Brenner

Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa

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

Orientadora: Sibeles Borsuk

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B838a Brenner, Gabriel

Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa / Gabriel Brenner ; Sibeles Borsuk, orientadora. — Pelotas, 2019.

48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Vacinas de subunidade. 2. Protein kinase G. 3. IgG. 4. Neuramidase H. I. Borsuk, Sibeles, orient. II. Título.

CDD : 615.372

Gabriel Brenner

Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa

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

Data da Defesa: 22 de novembro de 2019

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Sibeles Borsuk (Orientador)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dra. Thaís Larré Oliveira

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Mara Andrade Colares Maia

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

“Não devemos ter medo dos confrontos. Até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas” — Charles Chaplin

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a minha mãe Regina, meu irmão Alexandre, minha vó Niria e a toda a minha família devido ao apoio e por sempre me proporcionarem o melhor.

A minha orientadora Profa. Dra. Sibeles Borsuk, por me proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho e pela confiança depositada em mim nestes anos no laboratório. Agradeço também pelos conselhos recebidos e pela paciência demonstrada durante a realização deste trabalho.

A todos membros do LBIP pela convivência nestes últimos anos, pelas risadas e aprendizados. Em especial para o Rodrigo e a Mara pelos ensinamentos e conselhos durante a elaboração deste trabalho assim como durante todo o meu período no laboratório.

A Bárbara por ter se tornado realmente uma irmã para mim durante este último semestre apesar de todas as brigas e discussões e pela parceria nas festas e nos roles aleatórios por Pelotas.

A todos membros da Republica Maranhense por aguentarem meus surtos em casa e me ajudarem a manter os pés no chão e ver que tudo daria certo no final. Em especial ao Maicon e a Krystal pela parceria nestes últimos meses pelas festas, roles aleatórios, jantas e tantos outros momentos dignos de lembrança e também ao mestre Oberdan por ter tido paciência e não ter me expulso da casa até hoje assim como ter me apresentado alguns dos roles mais loucos da minha vida.

A todas pessoas que conheci durante meu tempo na Biotec principalmente aos integrantes do grupo da panela as Amandas, a Bárbara, aos Eduardos, a Giu, a Iza, a Nalaura as Vitorias e ao Vitinho.

Meus mais sinceros agradecimentos

Resumo

BRENNER, Gabriel. **Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa.** 2019. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente os pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos, seu agente etiológico é *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Seu tratamento é oneroso e ineficaz, a melhor forma de controle da doença é a vacinação. Vacinas comerciais possuem baixa eficácia, sendo a busca por novos alvos e formulações vacinais de importante, tendo como exemplos destes alvos a Neuraminidase H ou NanH, sialidase considerada um fator de virulência em potencial e a Protein kinase G ou PknG, proteína relatada por inibir a fusão do lisossomo com o fagolisossomo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação das proteínas rNanH e rPknG de *C. pseudotuberculosis* uma formulação vacinal contra LC. Para isso, *E. coli* foi transformada utilizando os plasmídeos pAE/nanH ou pD444-NH/pknG, e após foi realizada a expressão e purificação das proteínas rNanH e rPknG por cromatografia de afinidade e caracterização por *Western blot*. Camundongos Balb/c foram alocados em 2 grupos, GA: Solução salina (controle) 0,9% e GB: associação das proteínas recombinantes NanH e PknG com adição do adjuvante saponina, os animais receberam 2 doses com intervalo de 21 dias. O desafio foi realizado com 2 vezes a DL50 da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. A resposta imune humoral induzida foi verificada através de ELISA e *Western blot*. A formulação vacinal (GB) foi eficaz em induzir resposta imune específica, sendo possível observar um aumento significativo ($p < 0.05$) de IgG total nos soros dos animais do GB quando comparados com os soros dos animais do GA. O GB obteve uma taxa de sobrevivência de 40% após o desafio. Estudos futuros terão como objetivo avaliar novas formulações vacinais, utilizando estas proteínas comprovadamente promissoras, para controle da LC.

Palavras-chave: Vacina de subunidade; *protein kinase G*; IgG; Neuramidase H

Abstract

BRENNER, Gabriel. **Associação das proteínas recombinantes NanH e PknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa.** 2019. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Caseous lymphadenitis (CL) is a chronic infectious disease that mainly affects small ruminants, such as sheep and goats, characterized by abscess formation in lymph nodes, its etiological agent is *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Its treatment is costly and ineffective, the best way to control the disease is vaccination. Commercial vaccines have low efficacy, and the search for new targets and vaccine formulations is important, such as Neuraminidase H or NanH, sialidase considered a potential virulence factor and Protein kinase G or PknG, a protein reported to inhibit fusion of lysosome with phagolysosome. The aim of the present work was to evaluate the association of *C. pseudotuberculosis* rNanH and rPknG proteins in a LC vaccine formulation. To this end, *E. coli* was transformed using plasmids pAE/*nanh* or pD444-NH;*pknG*, and afterwards expression and purification of rNanH and rPknG proteins were performed by affinity chromatography and Western blot characterization. Balb / c mice were allocated into 2 groups, GA: 0.9% saline (control) and GB: association of recombinant proteins NanH and PknG with the addition of saponin adjuvant, the animals received 2 doses with 21 days interval. The challenge was performed with 2 times the LD50 of *C. pseudotuberculosis* virulent strain MIC-6. The induced humoral immune response was verified by ELISA and Western blot. Vaccine formulation (GB) was effective in inducing specific immune response, and it was possible to observe a significant increase ($p < 0.05$) of total IgG in GB animals sera when compared to GA animals sera. GB achieved a 40% survival rate after the challenge. Future studies will aim to evaluate new vaccine formulations using these proven promising proteins to control LC.

Key-words: Subunit vaccines: protein kinase G; IgG; Neuramidase

Lista de Figuras

Figura 1 – Avaliação da expressão das proteínas recombinantes NanH e PknG em <i>Escherichia coli</i> antes e após indução por IPTG através de SDS-PAGE.....	36
Figura 2 – Avaliação da purificação das proteínas recombinantes NanH e PknG e quantificação através de curva de BSA através de SDS-PAGE.....	37
Figura 3 – Caracterização das proteínas recombinantes utilizando anticorpo monoclonal anti-6x his tag através de <i>Western blot</i>	37
Figura 4 – Caracterização da imunogenicidade das proteínas rNanH e rPknG através de Western blot utilizando pool de soros do grupo B.	38
Figura 5 – Determinação dos nível dos isótipos de IgG (total, IgG1 e IgG2a) através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rNanH com os soros dos grupos pós-imunização.	39
Figura 6 – Determinação dos nível dos isótipos de IgG (total, IgG1 e IgG2a) através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rPknG com os soros dos grupos pós-imunização..	39
Figura 7 - Níveis de sobrevivência dos animais vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	40

Lista de Abreviações

µL	Micro litro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µM	Micro mols
°C	Grau celsius
BSA	Albumina de Soro Bonivo
CEEA	Conselho de Ética em Experimentação animal
CFU	Unidade formadora de colônia
CMNR	(<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus</i>)
DO	Densidade óptica
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
g	Gramma
GC	Guanina-citosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon tipo I: A forma gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IL-6	Interleucina 6
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilodalton
LB	Luria Bertani
MHz	Mega Hertz
LC	Linfadenite caseosa
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NanH	Neuramidase H
nm	Nanômetros
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PknG	<i>Protein kinase G</i>
PLD	Fosfolipase D
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
V	Volts

Sumário

1 Introdução Geral	13
2 Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 Revisão Bibliográfica.....	17
3.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	17
3.2 Linfadenite Caseosa	18
3.2.1 Impactos Econômicos.....	18
3.2.2 Epidemiologia e Transmissão.....	19
3.2.3 Patogenia e Imunologia.....	20
3.2.4 Diagnóstico.....	22
3.2.5 Tratamento, profilaxia e controle	23
3.2.6 Vacinas comerciais	24
3.2.7 Vacinas experimentais	24
3.2.8 Vacinas recombinantes de subunidade.....	25
3.3 NanH e PknG:.....	26
4 Metodologia	28
4.1 Amplificação do gene NanH.....	28
4.2 Clonagem do gene nanh no vetor pAE.....	28
4.3 Transformação em <i>Escherichia coli</i> e seleção dos clones recombinantes.....	29
4.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes NanH e PknG em <i>E. coli</i>	29
4.5 <i>Western blot</i>	30
4.6 Imunização dos camundongos.....	31
4.7 Coleta de sangue e desafio	31
4.8 Avaliação da resposta imune humoral por elisa indireto	32
4.9 <i>Western blot</i> para confirmar a imunogenicidade das proteínas.....	33
4.10 Análise estatística	33
5 Resultados.....	35
5.1 Expressão e purificação da proteína recombinante	35
5.2 Caracterização da proteína recombinante por <i>Western blot</i>	36

5.3 Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes	37
5.4 Avaliação da resposta imune humoral	37
5.5 Sobrevivência dos animais vacinados	39
6 Discussão	40
7 Conclusão.....	43
8 Referencias.....	44

1 Introdução Geral

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica, de ocorrência mundial, que afeta principalmente os pequenos ruminantes como ovinos e caprinos (COSTA et al., 2011). A LC apresenta-se de duas formas: LC externa, caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos externos e LC visceral, caracterizada por abscessos nos gânglios linfáticos internos e outros órgãos como os pulmões, fígado e rins (BAIRD et al., 2007; WINDSOR et al., 2011).

No Brasil existem mais de 9,5 milhões de cabeças de caprinos e mais de 17,9 milhões de cabeças de ovinos sendo o país o oitavo maior criador de ovinos e caprinos no mundo, o que demonstra a importância da ovinocaprinocultura para a economia brasileira (IBGE, 2017). As perdas econômicas causadas pela linfadenite caseosa se dão através da diminuição na produção de leite e no ganho de peso do animal, redução do preço da pele devido as cicatrizes geradas pelos abscessos e também pelo preço dos medicamentos e trabalho necessário para o tratamento dos abscessos superficiais causados pela doença (BAIRD et al., 2007).

O agente etiológico da LC é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bactéria intracelular facultativa, que exibe formas pleomórficas, não esporulante, não encapsulada e sem motilidade esse microrganismo pertence ao grupo dos actinomicetos, e juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* integram o grupo denominado CMNR (CONNOR et al., 2000; SELIM et al., 2001; DORELLA et al., 2006).

O tratamento da LC se dá através da remoção cirúrgica ou drenagem dos abscessos, seguido da limpeza e cauterização química com iodo 10 % (NOZAKI et al., 2000). Esta forma de tratamento é ineficaz nos abscessos internos e também traz riscos devido a liberação do microrganismo no ambiente no momento da remoção do abscesso (GUIMARÃES et al., 2011). A alternativa a este procedimento baseia-se na utilização de antibióticos sendo ineficaz, uma vez que *C. pseudotuberculosis in vivo* é protegido por uma cápsula fibrosa que pode formar biofilmes, encontrando-se localizado intracelularmente no piogranuloma formado em resposta a infecção, onde os

antibióticos não conseguem penetrar em sua totalidade (WILLIANSOM et al., 2001).

Sendo assim devido à dificuldade para se tratar a LC a imunoprofilaxia é a principal forma de se combater a doença. As vacinas comerciais utilizadas atualmente são bacterinas, inativadas através de formalina e vacinas de toxóide utilizando a fosfolipase D (PLD) (WINDSOR, 2011). Porém, as vacinas comercialmente disponíveis para a LC possuem baixas taxas de eficácia e proteção, necessitam doses reforço em conjunto com *boosts* anuais, além de causarem efeitos colaterais, como a formação de abscessos no local de injeção da vacina (PATON et al., 2010). Desta forma, faz-se necessário a pesquisa por novos alvos e formulações vacinais a fim de se obter melhores resultados no controle e profilaxia da doença (DORELLA et al., 2006).

Vacinas de subunidade recombinante utilizam proteínas purificadas junto com adjuvantes, possuindo potencial para desenvolver vacinas seguras e que possam modular a resposta imune para antígenos específicos (MOYLE et al., 2017).

A busca por novos alvos para vacinas de subunidade se dá principalmente através da vacinologia reversa (DROPPA-ALMEIDA et al., 2018). Dois alvos identificados por esta metodologia por Santana Jorge e colaboradores são a neuraminidase H (NanH), proteína responsável pela identificação de ácidos siálicos na membrana das células alvo do patógeno sendo assim um fator de virulência em potencial e a *protein kinase G* (PknG) proteína relatada por inibir a fusão do lisossomo como o fagolisossomo impedindo a fagocitose do patógeno permitindo assim a infecção dos macrófagos, estas proteínas também apresentaram um alto nível de epítomos maduros nas análises realizadas (NIEBISCH et al., 2006; KIM et al., 2010; SANTANA-JORGE et al., 2016).

A fim de se aproveitar da segurança e potencial de modular a resposta imune para alvos específicos das vacinas recombinantes de subunidade, o presente trabalho teve como proposta o desenvolvimento de uma formulação vacinal utilizando as proteínas rNanH e rPknG de *C. pseudotuberculosis* em associação devido à importância destas proteínas no momento de infecção do patógeno e pela quantidade de epítomos com potencial imunológico nestas

proteínas maduras. E posterior avaliação desta formulação em camundongos Balb/c, para o desenvolvimento de uma vacina para linfadenite caseosa.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar uma vacina de subunidade recombinante composta pelas proteínas rNanH e rPknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos

2.2 Objetivos Específicos

- Transformar *Escherichia coli* com os plasmídeos recombinantes pD444-NH;pknG e pAE/nanH;
- Expressar e purificar as proteínas recombinantes rNanH e rPknG em *E. coli*;
- Caracterização das proteínas recombinantes rNanH e rPknG por *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina
- Imunizar os camundongos Balb/c com a formulação vacinal contendo as proteínas recombinantes rNanH e rPknG;
- Avaliar a resposta imune humoral induzida pela vacina nos camundongos vacinados

3 Revisão bibliográfica

3.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O microrganismo *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence ao grupo dos actinomicetos, e juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* integram o grupo denominado CMNR (SELIM et al., 2001). Este grupo compartilha algumas características, como a organização da parede celular (formada por grandes complexos poliméricos compostos por peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos) e um alto conteúdo de GC no genoma (DORELLA et al., 2006).

A bactéria *C. pseudotuberculosis* é classificado como um patógeno intracelular facultativo, que exibe formas pleomórficas, podendo variar de cocóide a bacilar filamentoso, com tamanho entre 0,5 µm a 0,6 µm por 1 µm a 3 µm de diâmetro após 48 h de incubação (CONNOR et al., 2000). Caracteriza-se como uma bactéria não esporulante, não encapsulada e sem motilidade (DORELLA et al., 2006). Seu crescimento ideal se dá a 37 °C e pH entre 7 e 7,2, em meio sólido se inicia de forma escassa, com pequenas colônias, pela superfície do ágar, posteriormente organizando-se em paliçadas com colônias opacas de coloração entre o branco e o laranja, já em meio líquido *C. pseudotuberculosis* se desenvolve como depósitos granulares, com uma película na superfície (DORELLA et al., 2006).

Dois biovars de *C. pseudotuberculosis* já foram descritos, sendo eles o biovar *equi* isolado de equinos e bovinos e o biovar *ovis* isolado de caprinos e ovinos (BIBERSTEIN et al., 1971). Os biovars são diferenciados pela produção de nitrato redutase, sendo o biovar *equi* nitrato redutase positivo e o biovar *ovis* negativo para redução de nitrato (DORELLA et al., 2006). A existência dos dois biovars foi confirmada através de análises utilizando endonucleases de restrição (SONGER, 1988). Considerado um importante patógeno animal, é o agente etiológico da doença linfadenite caseosa (DORELLA et al., 2006).

3.2 Linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica, de ocorrência generalizada, que afeta principalmente os pequenos ruminantes (COSTA et al., 2011) causada pela bactéria *C. pseudotuberculosis*. A LC apresenta-se de duas formas: LC externa, caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos externos e de lesões purulentas que aparecem como abscessos em uma encapsulação fibrosa, estes abscessos posteriormente se rompem liberando secreção; e LC visceral, caracterizada por abscessos nos gânglios linfáticos internos e outros órgãos como os pulmões, fígado e rins, e mais raramente em áreas como o coração e cérebro (BAIRD et al., 2007; WINDSOR et al., 2011; VARELA-CASTRO et al., 2017).

A LC é uma enfermidade de extrema importância devido a sua distribuição global e grande impacto econômico, gerado devido a depreciação da pele, inviabilização da carcaça e diminuição da produção de lã e leite dos animais infectados (WINDSOR et al., 2011). Além disso, a infecção ocasionada por *C. pseudotuberculosis* pode afetar um amplo espectro de seres vivos, já tendo sido relatados casos tanto em animais de rebanho como em animais silvestres, como por exemplo, infecções pelo biovar *Ovis* em pequenos ruminantes tanto de criação quanto silvestres (ovinos e caprinos) e pelo biovar *Equi* em bovinos, equinos e mais raramente suínos, camelídeos e já houveram relatos de infecções em humanos por ambos os biovars, mostrando seu potencial zoonótico (BAIRD et al., 2007; TARAZI., 2016).

3.2.1 Impactos econômicos

Mesmo com a ocorrência de uma pequena queda na quantidade de rebanhos de ovinos e caprinos no Brasil no ano de 2017 em relação à 2016, a ovinocaprinocultura está em ascensão nos últimos anos, existindo no Brasil mais de 9,5 milhões de cabeças de caprinos e mais de 17,9 milhões de cabeças de ovinos (IBGE, 2017). O país é o oitavo maior criador de ovinos e caprinos no mundo, o que demonstra a importância da ovinocaprinocultura para a economia brasileira (IBGE, 2017).

Na região nordeste do Brasil a LC ganha ainda mais destaque, pois a ovinocaprinocultura além de ser uma importante fonte de renda e alimento para a população, a doença tem maior facilidade de transmissão devido a vegetação espinhosa da região (GUIMARÃES et al., 2011).

O impacto econômico real é difícil de ser calculado, não havendo uma estimativa para as perdas econômicas no Brasil, pois além da diminuição dos ganhos devido a todos os problemas já relatados é necessário a aplicação de verbas para inspeção detalhada das carcaças (GUIMARÃES et al., 2011). Como por exemplo, na Austrália, nos anos de 1991-1992, o custo de condenação e inspeção das carcaças e a redução na produção de lã custou valores entre US\$ 29.630.000,00–\$39.500.000,00 (WINDSOR et al., 2011).

As perdas econômicas causadas pela LC se ocorrem através da diminuição na produção de leite e no ganho de peso do animal, redução do preço da pele devido as cicatrizes geradas pelos abscessos e também pelo preço dos medicamentos e trabalho necessário para o tratamento dos abscessos superficiais causados pela doença (BAIRD et al., 2007). Esses efeitos são amplificados quando os linfonodos afetados estão em regiões críticas dos animais como por exemplo, a região das mandíbulas, das coxas ou úbere afetando negativamente a alimentação e a locomoção do animal e conseqüentemente o ganho de peso e produção de leite (GUIMARÃES et al., 2011).

3.2.2 Epidemiologia e transmissão

A LC já foi relatada em todos os continentes e, provavelmente, se disseminou através da importação de animais infectados (GUIMARÃES et al., 2011). Entre os anos de 1996 e 2004 dos 201 países que reportaram sua situação sanitária para a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), 64 deles declararam a existência de animais com a doença dentro de suas fronteiras, porém, esta provavelmente não é a situação real, uma vez que alguns países que relataram esta doença em artigos científicos não fizeram a declaração oficial, como principal exemplo o Brasil (GUIMARÃES et al., 2011, OIE, 2009).

A principal forma de infecção de novos rebanhos se dá através da inserção de animais doentes nos rebanhos sadios e mais raramente pode ocorrer a transmissão de rebanho a rebanho devido a ação humana, tanto através de equipamentos como roupas contaminadas, ambos funcionando como vetores mecânicos (BAIRD et al., 2007). A transmissão pode se dar tanto pelo contato do patógeno com a mucosa bucal, quanto por lesões na pele do animal, sendo que a principal fonte de infecção são animais infectados com lesões nos pulmões (PATON et al., 2010). Este tipo de lesão pulmonar gera aerossóis especialmente perigosos em lugares onde há o contato próximo com outros animais, ou um fluxo de ar reduzido como nos estábulos (PATON et al., 2010).

Ainda, casos de rápido aumento na soroprevalência de animais infectados com *C. pseudotuberculosis* já foram relatados mesmo em rebanhos onde não ocorriam abscessos externos (BAIRD et al., 2007). Outro fator de transmissão em potencial é a utilização de equipamentos infectados em animais sadios, devido má higienização dos mesmos, isso pode ocorrer em momentos de tosquia por exemplo e do alto tempo que a bactéria se mantém viável no ambiente, podendo sobreviver por meses sem um hospedeiro (WILLIANSOM et al., 2001; BAIRD et al., 2007).

Os casos de infecção em humanos se dão principalmente em trabalhadores com contato regular com ovelhas como pastores, tosquiadores e trabalhadores de abatedouros (GUIMARÃES et al., 2011). A infecção em humanos se dá de forma crônica gerando granulomas nos linfonodos axilares, cervicais e inguinais, o tratamento se dá através da excisão cirúrgica dos linfonodos afetados (BAIRD et al., 2007).

3.2.3 Patogenia e imunologia

Corynebacterium pseudotuberculosis pode ser considerado o “parasita perfeito”, pois após sua infecção e incubação no hospedeiro o mesmo consegue escapar da ação do sistema imune com aparente facilidade, causando uma infecção crônica que pode durar a vida inteira nos animais infectados (BAIRD et al., 2007). Essa capacidade de evasão pode ser explicada pelo fato de *C. pseudotuberculosis* ser uma bactéria intracelular

facultativa, que pode se multiplicar dentro dos macrófagos sobrevivendo as enzimas do fagolisossomo devido a sua camada lipídica externa da parede celular, que aumenta sua virulência (TARAZI, 2016). Uma vez que *C. pseudotuberculosis* sobrevive à fagocitose, associado ao fato de ser um parasito intracelular facultativo, faz com que a bactéria possa também utilizar os macrófagos como “meio de transporte” pelos canais linfáticos passando a colonizar outras áreas do corpo (BASTOS et al., 2012).

Outro importante fator de virulência do patógeno *C. pseudotuberculosis* é a exotoxina fosfolipase D (PLD) pois ela atua como um fator de permeabilidade (BASTOS et al., 2012). A PLD atua aumentando a permeabilidade da membrana vascular endotelial através da hidrólise da esfingomiélin e da dermonecrose de células endoteliais, isso permite que o patógeno passe da derme para os vasos sanguíneos promovendo a disseminação do local de infecção para os outros tecidos do animal (BAIRD et al., 2007)

A infecção pode ser dividida em fases, sendo elas a fase inicial com duração de 1 a 4 dias e caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos para o local de infecção e para o local de drenagem dos linfonodos; a fase de amplificação com duração de 1 a 5 dias e caracterizada pela formação do piogranuloma; e por último a fase de estabilização onde ocorre a evolução e estabilização do piogranuloma (BASTOS et al., 2012).

A imunidade contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto resposta celular quanto resposta humoral (GUIMARÃES et al., 2011). A resposta celular (Th1) se dá devido à natureza intracelular facultativa do patógeno, e pela produção de IFN- γ e outras citocinas importantes no controle da infecção (LAN et. al., 1999). A resposta imune humoral ocorre de 6 a 11 dias após a infecção, na qual, principalmente, citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 são produzidas no local de inoculação, enquanto citocinas associadas a células T como o IFN- γ são produzidos nos linfonodos de drenagem (GUIMARÃES et al., 2011).

3.2.4 Diagnóstico

A principal forma de diagnóstico da LC é o clínico, através da identificação dos abscessos e lesões causadas pela bactéria e posterior cultura e identificação de *C. pseudotuberculosis* através de testes bioquímicos (DORELLA et al., 2006). No entanto esta estratégia não é a ideal, pois a perfuração do abscesso no momento da obtenção do material purulento acaba liberando o patógeno no ambiente, o que pode ocasionar a infecção de mais animais no rebanho, além de um risco para o profissional que está realizando a coleta, havendo assim a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de testes menos invasivos (BASTOS et al., 2012).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado de diversas maneiras, sendo uma das mais utilizadas a caracterização do perfil bioquímico utilizando kits como o “API Coryne” kit (Biomérieux API®). O kit é composto por 21 testes bioquímicos diferentes, que atuam na determinação da atividade enzimática ou fermentação de carboidratos (DORELLA et al., 2006). Após inoculação do microrganismo alvo ocorrem mudanças de cor específicas nos testes, podendo ser tanto espontâneas como após a adição de reagentes (DORELLA et al., 2006). Em seguida os resultados obtidos são comparados com um banco de dados de um *software* específico do kit (BAIRD et al., 2007).

Outros exemplos de métodos de diagnóstico, mas em fase de estudo, são os ensaios de IFN- γ presente no sangue, que apresentaram uma sensibilidade de 89,2%; ELISAs utilizando a proteína fosfolipase D recombinante (rPLD) que demonstraram uma sensibilidade de 81% (MENZIES et al., 2004); PCR utilizando *primers* específicos para *C. pseudotuberculosis*, multiplex PCR baseado na amplificação dos genes *16s rDNA*, *rpoB* e *pld* (PACHECO et al., 2007) e outras técnicas como *Western blot* contra antígenos somáticos obtidos do extrato de *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA et al., 2008). Estes métodos de diagnóstico não estão disponíveis comercialmente e possuem um custo relativamente alto, inviabilizando a sua utilização em grandes rebanhos (VARELA-CASTRO et al., 2017; BASTOS et al., 2012).

3.2.5 Tratamento, profilaxia e controle

O tratamento da LC se dá através da remoção cirúrgica ou drenagem dos abscessos, seguido da limpeza e cauterização química com iodo 10 % (NOZAKI et al., 2000). Esta forma de tratamento geralmente é ineficaz, devido a presença de abscessos internos também podendo causar riscos ao rebanho e ao profissional responsável pelo procedimento, devido a liberação do microrganismo no ambiente no momento da remoção do abscesso (GUIMARÃES et al., 2011). A alternativa a este procedimento baseia-se na utilização de antibióticos, como penicilina e tetraciclina, porém, acabam sendo ineficazes, uma vez que *C. pseudotuberculosis in vivo* é protegido por uma cápsula fibrosa que pode formar biofilmes, encontrando-se localizado intracelularmente no piogranuloma formado em resposta a infecção, onde os antibióticos não conseguem penetrar em sua totalidade (WILLIANSOM et al., 2001). Sendo assim, a utilização de antibióticos em rebanhos torna-se inviável devido ao alto custo dos antibióticos e sua ineficácia no tratamento (BASTOS et al., 2012).

Uma forma efetiva de controlar e prevenir a doença seria através de inspeções clínicas, análises sorológicas periódicas no rebanho e nos animais recentemente adicionados a este, em associação à remoção de qualquer animal que apresentar sinais clínicos ou testes sorológicos positivos para LC (GUIMARÃES et al., 2011). Também devem ser adotadas medidas que diminuam os riscos de transmissão entre os animais, como a utilização de cercas de arame liso, desinfecção de instrumentos cirúrgicos e de tosa, utilização de agulhas descartáveis, controle de insetos e, sempre que possível aplicação de iodo 10% nas feridas dos animais (WILLIANSOM et al., 2001). Em conjunto, realizados programas educacionais para criadores e técnicos, informando as perdas econômicas e perigos causados pela doença (GUIMARÃES et al., 2011). Este tipo de prática de conscientização e diminuição de riscos ainda não é aplicada em diversos lugares do mundo, incluindo o Brasil, sendo assim a forma de profilaxia mais efetiva e acessível para se combater a LC nestes países seria através da vacinação.

3.2.6 Vacinas comerciais

As vacinas comerciais utilizadas atualmente são bacterinas, inativadas através de formalina; vacinas de toxóide utilizando a fosfolipase D (PLD), tendo como exemplo a Glanvac™ onde é utilizado toxóides combinados de *Clostridium* e *Corynebacterium*, outras vacinas combinadas utilizando bacterinas em combinação com o toxóide, tendo como exemplo a Caseous D-T que contém toxóides de *Clostridium perfringens* e *C. tetani* e *C. pseudotuberculosis* e vacinas atenuadas vivas como o caso da LinfoVac (GUIMARÃES et al., WINDSOR et al., 2011).

Porém, as vacinas comercialmente disponíveis para a LC possuem baixas taxas de eficácia e proteção, necessitam de doses de reforço em conjunto com *boosts* anuais, além de causarem efeitos colaterais, como a formação de abscessos no local de aplicação da vacina (PATON et al., 2010). Desta forma, faz-se necessário a pesquisa por novos alvos e formulações vacinais a fim de se obter melhores resultados no controle e profilaxia desta doença (DORELLA et al., 2006).

No Brasil a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) desenvolveu uma vacina disponível comercialmente baseada na cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* que é naturalmente atenuada, não causando a LC, esta vacina apresentou uma taxa de proteção de 83% nos testes vacinais, porém a vacina apresentou níveis variáveis de proteção nos testes de campo e, como citado, também apresenta alguns efeitos colaterais, como reações no local de aplicação (GUIMARÃES et al., 2011).

3.2.7 Vacinas experimentais

Uma vacina ideal para a LC deve apresentar uma taxa de proteção elevada e ter longa duração. (DORELLA et al, 2006). Uma das maiores dificuldades para se desenvolver uma vacina eficiente se deve ao fato de *C. pseudotuberculosis* ser um patógeno intracelular facultativo (WILLIANSON et al., 2001). Por este motivo, a vacina contra LC deve estimular além da resposta imune humoral, também a resposta imune celular (SYAME et al., 2018).

Atualmente existem diversos estudos e metodologias para desenvolvimento de novas formulações vacinais contra LC, tendo como exemplo vacinas vetorizadas: como o estudo de Leal e colaboradores, onde se utilizou rBCG expressando rPLD, obtendo um nível de proteção de 77% contra *C. pseudotuberculosis* em camundongos (LEAL et al., 2018).

Outros exemplos, que apresentaram menor taxa de sucesso são as vacinas atenuadas, como a Toxminus (PLD deficiente), porém esta abordagem falhou em estimular uma resposta imune significativa de células T helper 1 (WINDSOR et al., 2011) e vacinas de DNA, que proporcionam uma resposta celular fraca e de curta duração, não proporcionando concentrações de anticorpos estatisticamente superiores a animais não vacinados (DE ROSE et al., 2002).

3.2.8 Vacinas recombinantes de subunidade

Diversas formulações vacinais utilizando vacinas recombinantes de subunidade estão em processo de desenvolvimento, tendo como exemplo o estudo de Droppa-Almeida e colaboradores, onde foi utilizada a proteína rCP40 em conjunto do adjuvante de Freund na formulação vacinal, conferindo 100% de proteção contra *C. pseudotuberculosis* (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Outro exemplo desta metodologia foi a utilização de rPLD por Fontaine e colaboradores, obtendo bons resultados, onde apenas um dos 5 animais do estudo apresentou a disseminação da bactéria para além do local de inoculação de *C. pseudotuberculosis* após desafio (FONTAINE et. al., 2006).

O estudo de Silva e colaboradores utilizou uma combinação de rPLD + rCP01850 e rPLD + rCP09720 em formulações vacinais. A associação de rPLD e rCP01850 obteve um nível de proteção de 50% e demonstrou produção significativa de IgG 1 e IgG2a, além de mais intensa resposta imune inata e Th1. A resposta imune Th1 foi caracterizada por altos níveis de IFN- γ e TNF (SILVA et. al., 2018).

Estes estudos se mostram promissores, abrindo espaço para outros estudos envolvendo diferentes antígenos e adjuvantes em formulações vacinais, visando vacinas de subunidade recombinante contra *C. pseudotuberculosis*.

O principal método para a identificação de novos alvos é a vacinologia reversa, onde são realizados testes *in silico* para identificar antígenos não convencionais, que não são amplamente estudados (DROPPA-ALMEIDA et al., 2018). Um estudo recente realizado por Araújo e colaboradores utilizou este método para identificar novos antígenos potenciais, tendo como alguns dos principais candidatos as proteínas ndh, copC, ykuE, mtrB, ftls e senX3 (ARAÚJO et al., 2019). Outra análise *in-silico* realizada foi a de Santana-Jorge e colaboradores onde foi caracterizado e avaliado o potencial vacinal das proteínas SpaC, NanH, SodC e PknG (SANTANA-JORGE et al., 2016)

3.3 NanH e PknG:

A proteína NanH é uma sialidase ou neuramidase, que possui 694 aminoácidos e aproximadamente 71.5 kDa de peso molecular, pertencente a classe das glicosil hidrolases, estas sialidases são consideradas fatores de virulência em potencial, que contribuem para o reconhecimento de ácidos siálicos na superfície das células alvo, além disto, estas proteínas fazem parte da membrana celular fato importante para o reconhecimento do antígeno aumentando seu potencial vacinal (NCBI; KIM et. al 2010; SANTANA-JORGE et al, 2016).

A Neuramidase H de *Trueperella pyogenes* possui função de adesão nas células alvo se mostrando assim um importante fator de virulência para este patógeno (DONG et al., 2019). Na bactéria *Vibrio cholerae* a NanH tem como função encontrar ácidos siálicos que serão utilizados como fonte de carbono após serem quebrados por outras proteínas da bactéria (ALMAGRO-MORENO et al., 2009).

A proteína PknG ou *protein kinase G*, possui 749 aminoácidos e aproximadamente 83 kDa de peso molar, já foi relatada por inibir a fusão do lisosomo com o fagossomo, permitindo a sobrevivência intracelular do patógeno dentro do macrófago, além disto, mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* com exclusão do gene da PknG possuem crescimento reduzido *in-vitro*, mostrando que sua função não é limitada ao estilo de vida patogênico possuindo também uma importante função para a sobrevivência da bactéria

(NCBI; WALBURGER et. al, 2004; NIEBISCH et. al, 2006; SANTANA-JORGE et al, 2016).

Em *Mycobacterium* a PknG já foi relatada por ser um fator da resistência intrínseca a antimicrobianos (WOLFF et al., 2009). Outra função da PknG em *Mycobacterium* é a regulação do metabolismo de aminoácidos em conjunto com a proteína GarA que é substrato da PknG, estando envolvidas no catabolismo do glutamato, quando há perturbação na ação destas proteínas ocorre uma diminuição na virulência do patógeno devido uma desregulação no metabolismo de aminoácidos (RIECK et al., 2017).

No estudo de Santana-Jorge e colaboradores, foi apontado as proteínas NanH e PknG como alvos em potencial para o desenvolvimento de vacinas, devido a identificação *in silico* de diversos epítomos que possuem potencial para induzir resposta imune humoral e celular contra *C. tuberculosis*, este trabalho utilizou ProtParam e Self-Optimized prediction method with alignment—SOPMA para a identificação das características físico-químicas das proteínas, para a identificação dos epítomos reconhecidos por MHC I foi utilizado o software immune epitope database (IEDB) MHC I binding tool e para os epítomos reconhecidos por MHC II foi utilizado o software NetMHCII 2.2 server (SANTANA-JORGE et. al, 2016). Sendo assim, a associação destas proteínas em uma vacina de subunidade se torna interessante, devido à importância destas proteínas no momento de infecção do patógeno e pela quantidade de epítomos com potencial imunológico nestas proteínas maduras.

4 Metodologia

4.1 Amplificação do gene *nanH*

O DNA genômico da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis*, biovar *Ovis*, foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Illustra Bacteria genomicPrep Mini Spin kit (GE Health Care). O gene *nanH*, foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers F5' (5'-ATAGATCTATGCGCTGGTAACACTC-3') e R5' (5'-AAGGTACCTTAAAATGCCAGCAG-3').

A sequência codificadora do gene foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (GoTaq Coloress Master Mix – Promega). Foram construídas reações com um volume final de 25 µL contendo: 50 ng de DNA molde, 10 µM de *primer forward* e 10 µM de *primer reverse*, além de 12,5 µL de PCR Master mix e 9,5 µL de água. As amostras foram expostas por 5 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 60 s), anelamento (56 °C por 60 s) e extensão (72 °C por 90 s), e uma última etapa de 5 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e purificados utilizando o GFX PCR and Gel Band Purification kit (GE Healthcare)

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Invitrogen). Após a purificação, o gene *nanH* foi quantificado em espectrômetro NanoVue Plus (Biochrom)

4.2 Clonagem do gene *nanH* no vetor pAE

Após a purificação do gene *nanH* foi realizada uma reação de digestão utilizando as enzimas de restrição *Bgl*III e *Kpn*I (Invitrogen) tanto para o gene quanto para o plasmídeo pAE (RAMOS et al.2004), por 2 h a 37 °C. O resultado foi avaliado em gel de agarose 1%. Os produtos das digestões foram então purificados utilizando o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Invitrogen). A ligação do gene *nanH* ao vetor pAE foi realizada em reação de

ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 4° C por 16 h numa proporção de 75 ng/25 ng de inserto/vetor.

4.3 Transformação em *Escherichia coli* e seleção dos clones recombinantes

O produto da ligação foi utilizado para transformação da cepa TOP 10 de *E. coli*, por eletroporação. Foram utilizados 100 µL de células eletrocompetentes e 1 µl do produto de ligação. Após a transformação, as células foram transferidas para um eppendorf contendo 500 µL de meio Luria Bertani (LB) líquido e incubada a 37 °C, sob agitação, por 1 h e 30 min. Posteriormente, 100 µl foram semeadas em LB sólido, contendo ampicilina (100 µg/mL), permanecendo a 37 °C por 16 h.

As colônias isoladas das placas foram selecionadas e submetidas ao processo de triagem por extração rápida de DNA por fenol-clorofórmio (JOUGLARD et al., 2002). Os possíveis clones recombinantes, foram então selecionados e cultivados novamente em meio LB líquido, para posterior extração plasmidial com o kit ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) e clivagem com as mesmas enzimas de restrição para confirmação da presença do gene *nanH* no vetor pAE.

4.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes NanH e PknG em *E. coli*

Para a expressão das proteínas rNanH e rPknG, os plasmídeos pAE/*nanH* ou pD444-NH;*pknG*, plasmídeo comercial baseado no promotor do fago T5 e induzido por IPTG, (SANTANA-JORGE et al., 2016) foram utilizados para transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3), por choque-térmico. Uma colônia de cada transformação (pAE/*nanH* ou pD444-NH;*pknG*) foi selecionada e inoculada em 50 ml de meio LB líquido com adição de ampicilina a 100 µg/mL, este cultivo foi então incubado sob agitação a 37 °C por 16 h, após este tempo foi realizado um aumento de escala para 500 mL de LB líquido adicionado de ampicilina a 100 µg/mL e incubado

novamente a 37 °C sob agitação até atingir uma DO_{600} entre 0,6 e 0,8. Ao atingir esta DO_{600} a indução proteica foi realizada utilizando IPTG 1 mM por 3 h, após este tempo a cultura foi centrifugada a 7.000 g por 15 min a 4 °C e o pellet suspenso em PBS 1X (Tampão fosfato-salino) estéril com adição de lisozima a 100 µg/mL, sendo sonicado (15 pulsos de 60MHz por 15 segundos com intervalos de 15 segundos entre os pulsos) para promover a lise celular. Em seguida as células lisadas foram mantidas sob agitação em câmara fria a 4°C por 30 min. Em seguida foi realizada nova centrifugação a 7000 g por 15 minutos e o pellet suspenso em tampão Akta wash com uréia (50mM NaH_2PO_4 ; 300mM NaCl; 20mM Imidazole; 8M ureia) para solubilização das proteínas rNanH e rPKNG, mantido sob agitação por 16 h em câmara fria a 4°C. Posteriormente foi realizada uma centrifugação de 40 minutos a 10000 g, o sobrenadante resultante foi filtrado e após foi realizada a purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap). Posteriormente foi realizada diálise com tampão Tris-HCl para *refolding* da proteína e a determinação da concentração por meio de curva de BSA

4.5 Western blot

Para a realização do Western blot foram utilizados 40 µL da proteína purificada e 10 µL de tampão SDS-PAGE 5X (azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM), para um volume final de 100 µL. Após, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e submetidas a SDS-PAGE 12%.

As proteínas presentes nas amostras do gel SDS-PAGE (12%) foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Nitrocellulose Blotting Membrane – GE Health Care), a 140V e amperagem de 400 por 1 h e 30 min. 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 (PBS 1x + 0,05% Tween) durante 30 segundos cada, após as lavagens foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-6Xhistidina (Sigma Aldrich) na diluição de 1:4000 em PBS-T. O processo de lavagem foi repetido, nas mesmas condições, e a membrana foi novamente submetida a leve agitação por 1 h

com anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:4000 em PBS-T. Por fim, a membrana foi lavada cinco vezes, durante 1 minuto cada, com PBS-T e a revelação da reação foi realizada através de solução reveladora (0,012 g de Diaminobenzidine, 1 ml de sulfato de níquel 0,3%, 9 ml de tampão Tris HCl 50 mM e 50 µl de H₂O₂).

4.6 Imunização dos camundongos

Para o experimento de imunização, 20 camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, suscetíveis a infecção por *C. pseudotuberculosis* foram utilizados como modelo animal. O experimento foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA/UFPel) sob o número 2442. Os camundongos foram mantidos em condições adequadas de temperatura e umidade, ciclo de claro e escuro de 12 h e água e comida *ad libitum*.

Os animais foram alocados em 2 grupos com 10 camundongos cada, sendo eles GA: (controle negativo), que foi inoculado por via subcutânea com 200 µL de solução salina estéril 0,9% e GB: imunizado com 50 µg das proteínas recombinantes (25 µg de rNanH e 25 µg de rPknG) adicionados de 7,5 µg de saponina, escolhida por estimular a resposta imune celular e a produção de anticorpos, como adjuvante em uma solução salina estéril, as vacinas foram mantidas por 16 h sob agitação a 4 °C antes de serem utilizadas. Os camundongos imunizados receberam duas doses da vacina com um intervalo de 21 dias.

4.7 Coleta de sangue e desafio

Amostras de sangue foram coletadas utilizando pipetas *Pasteur* a partir do plexo retro-orbital dos animais, devidamente anestesiados com isoflurano, no dia 0 (antes da imunização), dia 21 (antes da segunda imunização) e 42 dias após a primeira imunização. As amostras coletadas foram imediatamente processadas através de centrifugação a 1500 g por 15 minutos, e o soro foi

coletado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da quantificação de imunoglobulinas por ELISA indireto.

Para avaliar os níveis de proteção, os animais foram desafiados com 2 vezes a DL50 que corresponde a 10^4 CFU da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, 21 dias após a última imunização. Os animais foram observados diariamente por 50 dias após o desafio.

4.8 Avaliação da resposta imune humoral por ELISA indireto

Um ELISA indireto foi realizado, como descrito por Rebouças e colaboradores com modificações, para determinação de anticorpos específicos (REBOUÇAS et al., 2013). O nível de anticorpos presente no soro foi avaliado para ambas as proteínas recombinantes anti-rNanH ou anti-rPknG. Uma placa de ELISA com 96 poços foi sensibilizada com $0,1\text{ }\mu\text{g/poço}$ de uma das proteínas recombinantes, sendo realizadas placas separadas para cada uma das proteínas, diluídas em tampão bicarbonato-carbonato (pH 9,8). Após 3 lavagens com PBS-T as placas foram bloqueadas utilizando $200\text{ }\mu\text{L/poço}$ de 5% de leite desnatado em PBS-T. Foram feitas 3 lavagens e adicionados $100\text{ }\mu\text{L/poço}$ de soro dos camundongos (diluído 1:50 em PBS-T) em duplicata, após uma hora de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 3 lavagens com PBS-T foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L/poço}$ de um anticorpo anti camundongo para IgG total conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) (diluído 1:5000 em PBS-T) para a detecção de IgG total.

Para se detectar IgG1 e IgG2a, $100\mu\text{L/poço}$ de anti IgG1 de camundongo produzido em cabra (diluído 1:5000 em PBS-T) ou anti IgG2a de camundongo produzido em cabra (diluído 1:2000 em PBS-T) foram adicionados as placas respectivamente. As placas contendo os isótipos foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h e então lavadas 3 vezes com PBS-T. Para a detecção de IgG1 e IgG2a um passo a mais foi realizado, incluindo a adição de $100\text{ }\mu\text{L/poço}$ de anticorpo IgG anti-cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) que foi diluído 1:5000 em PBS-T. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h e então lavadas 5 vezes com PBS-T. A reação foi iniciada com a adição de $100\text{ }\mu\text{L/poço}$ de uma solução contendo 0.04% H_2O_2 e 0,01 g de o-fenilenodiamina dicloridrato em 10 mL de tampão citrato-fosfato (pH 5,0) e a

placa foi incubada em temperatura ambiente no escuro por 15 min, a reação foi parado com 50 µL/poço de uma solução de 4N H₂SO₄ e então a absorbância foi medida a 492 nm.

4.9 Western blot para confirmar a imunogenicidade das proteínas

Foi realizado um *Western blot* contra um *pool* de soros coletados dos animais do grupo vacinado com a associação de rNanH e rPknG com adição de saponina (Grupo B) após 42 dias da primeira dose. Foram preparadas amostras contendo 5 µg de rNanH e rPknG misturadas com tampão de SDS-PAGE, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos e submetidos a SDS-PAGE 12%.

As proteínas presentes nas amostras do gel SDS-PAGE (12%) foram 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 com adição de 0,05% Tween durante 30 segundos cada, após as lavagens a membrana foi cortada em tiras e adicionadas as amostras de soro dos grupos GA ou GB do dia 42 foram adicionadas separadamente e incubadas a 37 °C por uma hora. 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-Aldrich) na diluição 1:4000 em PBS-T. Por fim, a membrana foi lavada cinco vezes, durante 1 minuto cada, com PBS-T e revelado através de solução reveladora (0,012 g de Diaminobenzidina, 1 ml de sulfato de níquel 0,3% e 9 ml de tampão Tris HCl 50 mM e 50 µl de H₂O₂).

4.10 Análise estatística

Todas análises estáticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 7 para *Windows* (GraphPad Software). As diferenças nas taxas de mortalidade e de sobrevivência entre o grupo imunizado e controle foram

analisados por teste exato de Fisher e Log-rank respectivamente. A diferença entre os níveis de produção de IgG foram avaliados por análise de variância de uma via seguido pelo teste de Tukey. Diferenças estatísticas significantes consideraram valor de $p < 0.05$

5 Resultados

5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A figura 1 demonstra a expressão das proteínas rNanH e rPknG em *E. coli* após a indução proteica através de IPTG sendo possível observar um aumento na expressão de ambas as proteínas após a indução. As proteínas apresentam seu peso molecular esperado, sendo o da rNanH de 71,5 kDa e o da rPknG de 83 kDa.

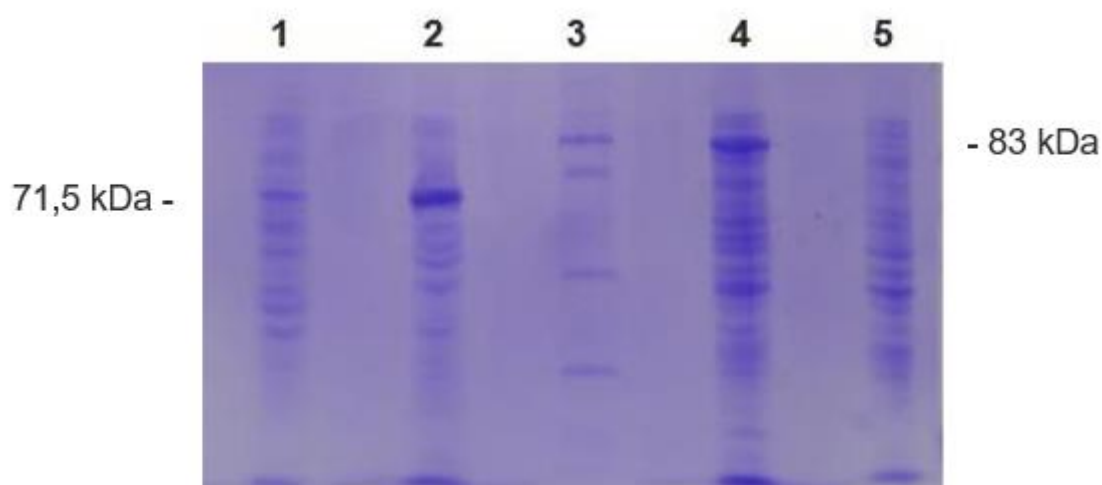


Figura 1: Avaliação da expressão das proteínas recombinantes NanH e PknG em *Escherichia coli* antes e após indução por IPTG através de SDS-PAGE 12%: (1) *E. coli*/NanH não induzida; (2) *E. coli*/NanH induzida; (3) Marcador não corado (Thermo Scientific); (4) *E. coli*/PknG induzida; (5) *E. coli*/PknG não induzida.

Após a purificação, diálise e concentração das proteínas recombinantes elas foram aplicadas em SDS-PAGE 12% para avaliar efetividade da purificação. Após a purificação obteve uma banda única aparentemente livre de contaminação para ambas as proteínas (Figura 2). As proteínas foram num rendimento de aproximadamente 13,6 mg/L para rNanH e de 6,8 ng/L de rPknG

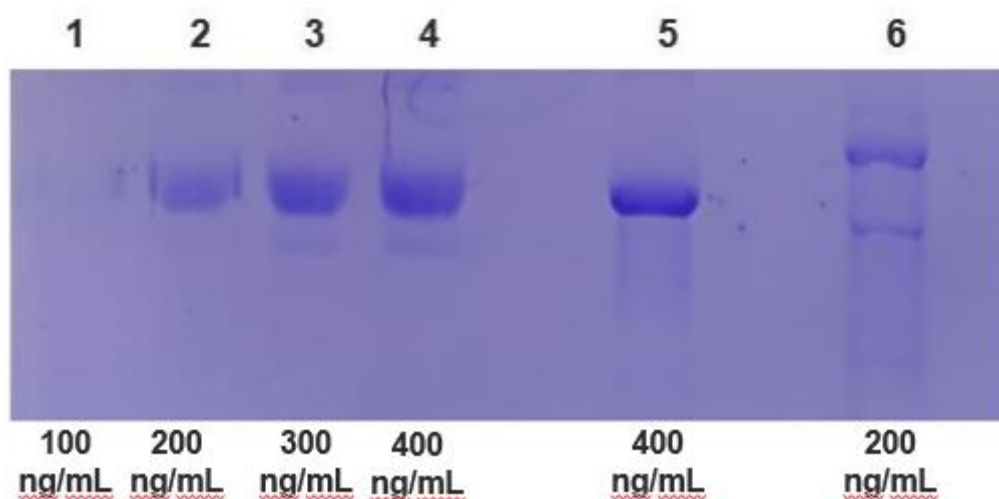


Figura 2: Avaliação da purificação das proteínas recombinantes NanH e PknG e quantificação através de curva de BSA em SDS-PAGE 12%: (1-4) Curva de BSA de 100 a 400 mg/mL de BSA; (5) rNanH purificada (6) rPknG purificada

5.2 Caracterização da proteína recombinante por *Western blot*

Um *Western blot* foi realizado utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhistidina para confirmar a identidade das proteínas recombinantes purificadas (Figura 3). Pode ser observado bandas reativas no tamanho esperado das proteínas, 71,5 kDa para a NanH e 83 kDa para a PknG.

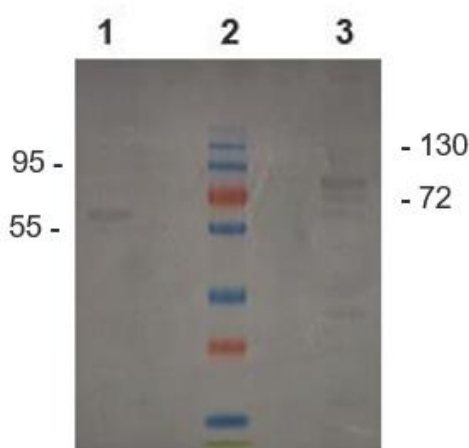


Figura 3: Caracterização das proteínas recombinantes utilizando anticorpo monoclonal anti-6x his tag (Sigma Aldrich) através de WB. (1) Proteína rNanH purificada; (2) Marcador de peso molecular para proteína pré-corado (Thermo Scientific); (3) Proteína rPknG purificada.

5.3 Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes

A imunogenicidade das proteínas foi avaliada através de um *Western blot* (Figura 4) contra um *pool* de soros coletados dos animais do grupo vacinado com a associação de rNanH e rPknG com adição de saponina (Grupo B) após 42 dias da primeira dose. Nesta avaliação foi possível observar que o *pool* de soros do grupo vacinado com a associação das proteínas recombinantes rNanH e rPknG foi reativo para ambas as proteínas rNanH e rPknG

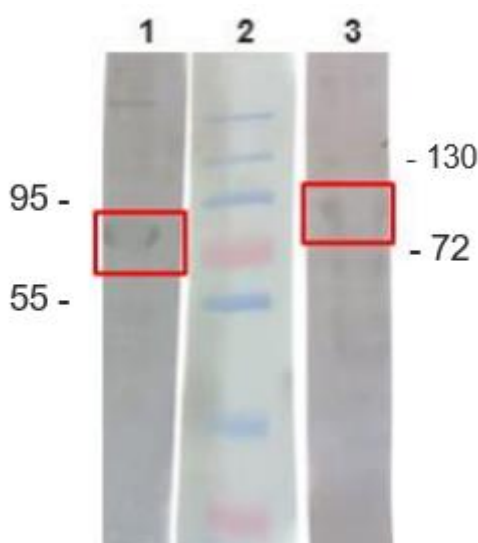


Figura 4: Caracterização da imunogenicidade das proteínas rNanH e rPknG através de Western blot utilizando pool de soros dos animais imunizados. (1) rNanH purificada (71,5 kDa) (2) Marcador Pré-corado (Thermo Scientific); (3) rPknG purificada (83 kDa)

5.4 Avaliação da resposta imune humoral

Os soros dos animais imunizados com formulação vacinal e do grupo controle foram avaliados através de ELISA indireto para a determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 específicos contra cada uma das proteínas (Figuras 5 e 6)

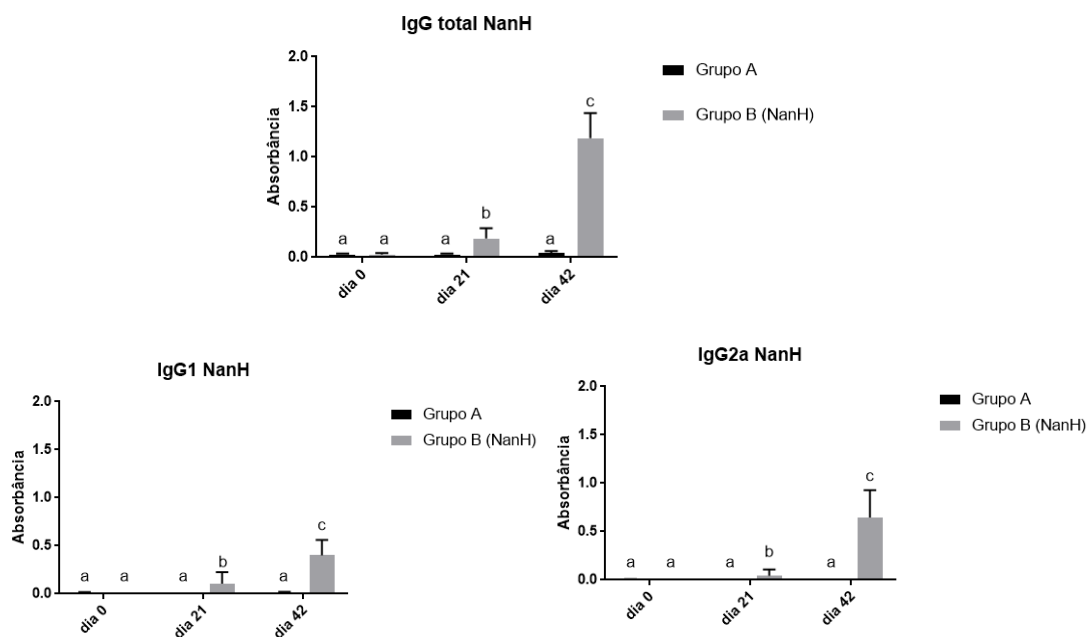


Figura 5: Determinação dos níveis dos isótipos de IgG (total, IgG1 e IgG2a) através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rNanH com os soros dos grupos nos dias 0, 21 e 42 pós-imunização. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento com dez animais por grupo de imunização. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes dos outros grupos dentro de cada gráfico ($p < 0,05$).

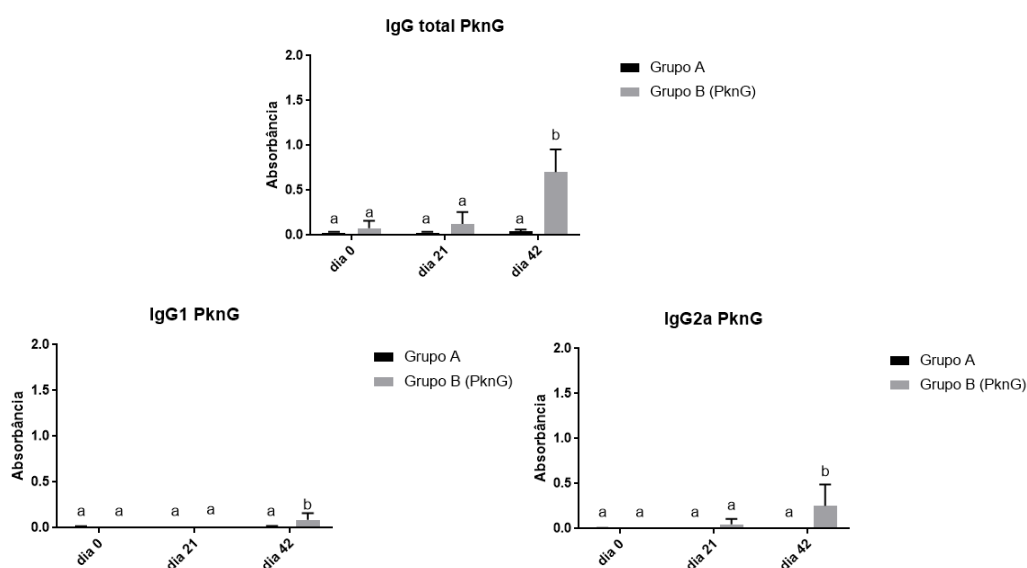


Figura 6: Determinação dos níveis dos isótipos de IgG (total, IgG1 e IgG2a) através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rNanH com os soros dos grupos nos dias 0, 21 e 42 pós-imunização. Os resultados estão

apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento com dez animais por grupo de imunização. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes dos outros grupos dentro de cada gráfico ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstram um aumento nos níveis de produção dos 2 isótipos de IgG específico avaliados tanto contra a proteína rNanH quanto contra a proteína rPknG nos animais vacinados com a associação de rNanH e rPknG com adição de saponina como adjuvante (grupo B) quando comparadas ao grupo A (controle).

5.5 Sobrevivência dos animais vacinados

Após 21 dias da segunda dose, os animais foram desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* e avaliados diariamente por 50 dias. Todos os animais do grupo controle (Grupo A) vieram a óbito até o dia 42 pós-desafio, os animais vacinados com a associação das proteínas rNanH e rPknG com adição de saponina como adjuvante (Grupo B) obteve uma taxa de sobrevivência de 40% não obtendo diferença estatística (Figura 8).

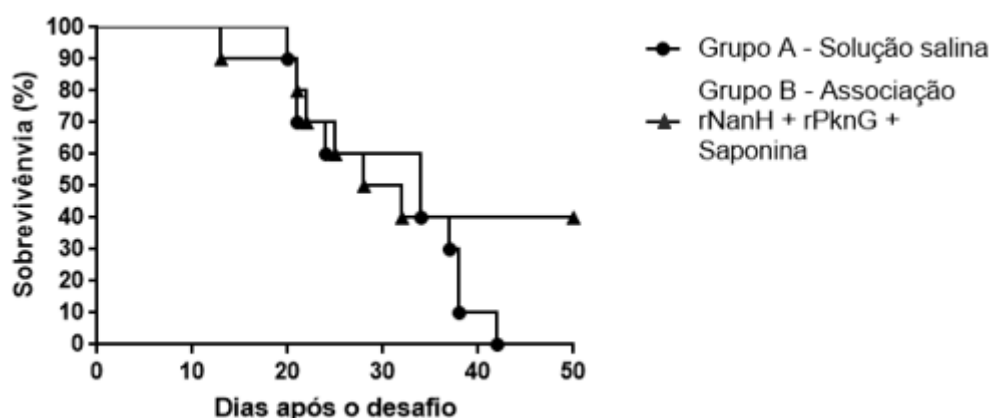


Figura 7: Níveis de sobrevivência dos animais vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

6 Discussão

A linfadenite caseosa (LC) causada pela bactéria *C. pseudotuberculosis*, é uma doença infecciosa crônica, de ocorrência mundial, que afeta principalmente os pequenos ruminantes como ovinos e caprinos (COSTA et al., 2011). Esta doença, gera perdas econômicas ao setor da ovinocaprinocultura, devido à diminuição no ganho de peso e produção de leite e pela diminuição do valor comercial das peles e na capacidade reprodutiva dos animais afetados (GUIMARÃES et al., 2011; WINDSOR, 2011).

As vacinas para LC devem imunizar o alvo contra *C. pseudotuberculosis* de forma que o animal responda de maneira rápida e eficiente quando entrar em contato com o patógeno evitando o desenvolvimento e transmissão da doença (DORELLA et al., 2006).

Neste estudo avaliou-se o potencial vacinal das proteínas NanH e PknG de *C. pseudotuberculosis* em associação. Estas proteínas são importantes na virulência, metabolismo e crescimento do patógeno e devido ao potencial vacinal apresentado nas análises *in-silico* realizadas previamente, apresentando um alto número de epítomos com potencial para gerar resposta imune celular e humoral (SANTANA-JORGE et al., 2016).

A expressão das proteínas recombinantes utilizando um sistema de expressão heteróloga foi realizada com sucesso, utilizando a cepa *E. coli* BL21 star (DE3) e os vetores de expressão pAE e pD444-NH. A *E. coli* é o sistema bacteriano mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes em laboratórios de pesquisa (CHEN, 2012). A cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) utilizada possui um mRNA com maior estabilidade devido a uma mutação de um gene codificante para uma RNase e possui uma T7 RNA polimerase controlada pelo promotor *lacUV5* que é induzida por IPTG e aumenta o nível de expressão de plasmídeos T7 como o pAE e T5 como o pD444-NH (INVITROGEN, 2003).

Os vetores utilizados, pAE e pD444-NH, adicionam uma “cauda” com 6 histidinas a proteína alvo, fato que permite a purificação das proteínas através de cromatografia de afinidade ao níquel. Uma vantagem da utilização da “cauda” de histidina é a possibilidade de se purificar a proteína desnaturada uma vez que a interação entre a coluna de níquel e os resíduos de histidina é

estável em altas concentrações de ureia (8 M) como as utilizadas no estudo, após a purificação foi então realizada uma dialise para *refolding* das proteínas utilizando tampão Tris-HCl para a remoção da ureia, tanto o processo de purificação quanto o de dialise foram eficientes (RAMOS et al., 2004).

A caracterização das proteínas recombinantes foi realizada através da técnica de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-6xHIS para a identificação da “cauda” de histidina adicionada as proteínas alvo, o *WB* mostrou bandas reativas na altura esperada pelo peso molecular das proteínas utilizadas no estudo, confirmando assim a identidade das proteínas obtidas.

O adjuvante escolhido para este estudo foi a saponina, glicosídeos com propriedades detergentes e surfactantes, estimula tanto a resposta humoral quando a celular e induz a diferenciação de isótipos de anticorpos, sendo assim um adjuvante interessante para utilização em formulações vacinais contra linfadenite caseosa por estimular ambos os tipos de resposta imune (SUN et al., 2009).

A associação das proteínas recombinantes foi realizada pois estudos como o de Silva e colaboradores, onde foram utilizadas a proteína rCP01850 ou a proteína rCP0920 em associação com a proteína rPLD, mostraram um aumento no nível de produção de IgG2a com a associação de rPLD + rCP09720 e um aumento na taxa de sobrevivência dos animais vacinados com rPLD + rCP01850 (SILVA et al., 2018). Esse estudo mostra o potencial da metodologia de associação de proteínas recombinantes como a utilizada nesse estudo.

Embora anticorpos não sejam o fator principal de proteção contra *C. pseudotuberculosis* uma vez que se trata de um patógeno intracelular, a resposta imune humoral pode ajudar na inativação do patógeno, sendo assim o aumento no nível de IgG total gerado pela vacinação com a associação de proteínas recombinantes se mostra positiva (SILVA et al., 2018).

A taxa de sobrevivência dos animais desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* foi de 40% não mostrando diferença estatística, porém estudos similares mostram um aumento na taxa de sobrevivência dos animais utilizando adjuvantes diferentes para a mesma proteína como o estudo de Droppa-Almeida e colaboradores que mostrou uma taxa de sobrevivência maior utilizando a proteína CP40 com o adjuvante de

Freund quando comparado ao estudo de Silva e colaboradores utilizando a mesma proteína com o adjuvante saponina (SILVA et al., 2014; DROPPA-ALMEIDA et. al 2016). Sendo assim a utilização de outros adjuvantes em conjunto com a associação das proteínas rNanH e rPknG pode se mostrar promissora em estudos futuros.

7 Conclusão

A clonagem e expressão das proteínas recombinantes rNanH e rPknG de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *Escherichia coli* foram realizadas com sucesso assim como a sua posterior purificação por cromatografia de afinidade, a identidade das proteínas recombinantes foi confirmada através de *Western blot* anti-histidina.

A formulação vacinal utilizando a associação das proteínas recombinantes com adição de saponina foi eficiente em produzir anticorpos IgG1 e IgG2a contra ambas as proteínas recombinantes porem não obteve uma taxa de sobrevivência estatisticamente superior ao grupo controle. Para melhorar os índices de sobrevivencia da formulação vacinal testada, as proteínas recombinantes NanH e PknG podem ser avaliadas em associação com outras proteínas de *C. psudotuberculosis*, e ainda uso de novos adjuvantes para melhorar a eficacia, as proteínas NanH e PknG também podem ser avaliadas como vacinas vetorizadas ou bacterinas recombinantes.

8 Referencias

- ARAÚJO et al. Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. **Gene**, 2019
- ALMAGRO-MORENO, S., & BOYD, E. F. (2009). Sialic Acid Catabolism Confers a Competitive Advantage to Pathogenic *Vibrio cholerae* in the Mouse Intestine. **Infection and Immunity**, 2009.
- BAIRD, G. J., & FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, 2007.
- BASTOS, B. L. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Clinical e Cellular Immunology**, 2012.
- BASTOS, R. G., BORSUK, S., SEIXAS, F. K., & DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, 2009.
- BIBERSTEIN E. L., et al., Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Vet. Rec.** 1971.
- BROGDEN KA, GLENN JS, EAST N: A *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin with muramyl dipeptide induces antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring eternal abscesses in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, 1996.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, 2012.
- CONNOR K.M., et al., Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, **J. Clin. Microbiol.** 2000.
- 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**, 2011.
- DE ROSE, et al., Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2002.

DONG, W.-L., LIU, L., ODAH, K. A., ATIAH, L. A., GAO, Y.-H., KONG, L.-C., & MA, H.-X. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Trueperella pyogenes* isolated from pig lungs with pneumonia. **Tropical Animal Health and Production**, 2019.

DORELLA, F.A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, 2006.

DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W. L. P., SILVA, K. K. O., REZENDE, A. F. S., SIMIONATTO, S., MEYER, R., ... PADILHA, F. F.. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, 2016.

DROPPA-ALMEIDA, et al., Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis* **Bioinform Biol Insights**, 2018

FONTAINE, M., et al., Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, 2006.

GUIMARÃES, A. D. S. et al. Caseous Lymphadenitis: **Epidemiology, Diagnosis, and Control. The IIOAB Journal** , 2011.

KONG, C.U., et al.. Targeted induction of antigen expression within dendritic cells modulates antigen-specific immunity afforded by recombinant BCG. **Vaccine**, 2011

IBGE <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939> acessado em: 15/05/2019

INVITROGEN. Discover a star-studded cast of competent cells: for all your transformation needs. 2003. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/710-021761-B%20Comp%20Cell%20Fin.pdf>

JOUGLARD, S.D.M.M.A., VAZ, E.K., BASTOS, R.G., DA CUNHA, C.W. & ARMOA, G. R. G. DELLAGOSTIN, O.A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, 2002.

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**, 2010

LAN DTB, MAKINO S, SHIRAHATA T et al. Tumor necrosis factor and γ interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **J Vet Med Sci**, 1999.

LANGERMANN S, PALASZYNSKI SR, BURLEIN JE, KOENIG S, HANSON MS, BRILES DE, et al. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette–Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein **A. J Exp Med**, 1994..

LEAL et al., Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. **Vaccine**, 2018.

MENZIES P. I., et al., Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experiment.ally infected goats. **Vet Microbiol**, 2004.

MOURA-COSTA et al., Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet Immunol Immunopathol**, 2008.

MOYLE, P. M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. **Biotechnology Advances**, 2017.

NIEBISCH A, KABUS A, SCHULTZ C, WEIL B, BOTT M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the Odhl protein. **J Biol Chem**, 2006.

NOZAKI C.N., Faria MAR, Machado TMM. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arq Inst Biol**, 2000.

PACHECO L. G. C., et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med Microbiol**, 2007.

PATON, M. W. et al. The Epidemiology and Control of Caseous Lymphadenitis in Australian Sheep Flocks, **tese de doutorado Murdoch University**, 2010

RAMOS, C. R. R., ABREU, P. A. E., NASCIMENTO, A. L. T. O., & HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of

recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2004.

RAPPUOLI, R., Reverse vaccinology. **Curr Opin Microbiol**, 2000.

REBOUÇAS MF, LOUREIRO D, BASTOS BL, MOURA-COSTA LF, HANNA SA, AZEVEDO V, et al. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesqui Vet Bras**, 2013.

RIECK, B., DEGIACOMI, G., ZIMMERMANN, M., CASCIOFERRO, A., BOLDRIN, F., LAZAR-ADLER, N. R., O'HARE, H. M., PknG senses amino acid availability to control metabolism and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLOS Pathogens**, 2017.

SANTANA-JORGE, K. T. O., SANTOS, T. M., TARTAGLIA, N. R., AGUIAR, E. L., SOUZA, R. F. S., MARIUTTI, R. B., ... AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell Factories**, 2016.

SELIM S.A., Oedematous skin disease of buffalo in Egypt, **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, 2001.

SELIM S.A., M.E. Ghonein, K.H.F. Mohamed Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. **J Microbiol Res**, 2010.

SILVA, M. T. DE O., BEZERRA, F. S. B., DE PINHO, R. B., BEGNINI, K. R., SEIXAS, F. K., COLLARES, T., BORSUK, S. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, 2018

SONGER J.G., et al., Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Am. J. Vet. Res.** 1988.

Sun, H.-X., Xie, Y., & Ye, Y.-P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, 2009.

SYAME S.M. et al., Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for caseous lymphadenitis in sheep challenged **Vet World**. 2018

TARAZI Y, A.F.. An outbreak of dermatophilosis and caseous lymphadenitis mixed infection in camels (*Camelus dromedaries*) in Jordan. **J Infect Dev Ctries**, 2016.

VARELA-CASTRO, L et al., Endemic caseous lymphadenitis in a wild Caprinae population. **Veterinary Record**, 2017.

WALBURGER, A., KOUL, A., FERRARI, G., NGUYEN, L., PRESCIANNOTTO-BASCHONG, C., HUYGEN, K., KLEBL, B., THOMPSON, C., BACHER, G., AND PIETERS, J. **Science** 2004.

WINDSOR, P. A. . Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 2011.

WILLIANSO, L. H.. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North AmericaçFood Animal Practice**, (2001). 17, 359^371.

WOLFF, K. A., NGUYEN, H. T., CARTABUKE, R. H., SINGH, A., OGWANG, S., & NGUYEN, L. Protein Kinase G Is Required for Intrinsic Antibiotic Resistance in *Mycobacteria*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2009

VALE VLC, SILVA M DA C, 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.