

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Diferentes estratégias vacinais utilizando o gene
CP1002-RS9720 de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis para o controle da Linfadenite
caseosa**

Alexandre Brum

Pelotas, 2019

Alexandre Brum

**Diferentes estratégias vacinais utilizando o gene CP1002-RS9720 de
Corynebacterium pseudotuberculosis para o controle da Linfadenite caseosa**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Ciências
(Biotecnologia aplicada à produção animal)

Orientador: Dra. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B893d Brum, Alexandre Antunes

Diferentes estratégias vacinais utilizando o gene
Cp1002-RS9720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*
para controle da linfadenite caseosa / Alexandre Antunes
Brum ; Sibeles Borsuk, orientadora. — Pelotas, 2019.

54 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Linfadenite caseosa. 2. *Corynebacterium*
pseudotuberculosis. 3. Vacina de dna. 4. Vacina de
subunidade. 5. Cp1002_RS09720. I. Borsuk, Sibeles, orient.
II. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Daniela Ramos (FURG)

Prof. Dr^a. Thais Larre (UFPel, CDTec)

Prof. Dr^a. Fabiana Seixas (UFPel, CDTec)

Prof. Dr^a. Sibeles Borsuk (Orientador, UFPel, CDTec)

Para minha esposa, filhos e pais, com carinho e gratidão.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CDTec pelo acolhimento, a CAPES e ao CNPQ por incentivar e viabilizar esta pesquisa.

A minha orientadora Sibeke Borsuk.

Aos demais professores e colegas que fizeram parte do trabalho, ajudando e esclarecendo as dúvidas do percurso e contribuindo na minha formação, inclusive, em especial a professora Claudia Hartleben que teve contribuição neste processo pela qual oramos pelo seu bem estar.

A minha esposa Aline Brum por me incentivar e me apoiar nessa caminhada e todos os demais que contribuíram para o cumprimento de mais essa etapa. Manifesto minha satisfação em fazer parte desse processo de formação nessa instituição junto a pessoas de tão alto calão e qualificação científica e tecnológica.

Foram anos de aprendizado prático e pessoal em um processo que se mostrou desafiador e esclarecedor ao mesmo tempo, ao promover o entendimento e a compreensão de minúcias da vida através do manuseio da molécula básica dos seres vivos, lhe empreende a dinâmica das possibilidades e das ferramentas a cargo do homem moderno, cuja responsabilidade é gigantesca na melhoria das condições de vida bem como na redução dos danos que o próprio homem causa a si mesmo.

Finalizo dizendo que cumpro esse período com satisfação e com plena certeza de que existe um ser humano mais esclarecido, um pesquisador mais instrumentalizado e um profissional mais capacitado para enfrentar as intempéries da vida acadêmica atual.

“Quando o homem aprender a respeitar até mesmo o menor ser da criação ninguém
precisará lhe ensinar a amar seu semelhante”
Albert Schweitzer

Resumo

BRUM, Alexandre. **Avaliação de vacinas recombinantes para o controle da Linfadenite caseosa**. 2019. 54f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Usando-se a metodologia de clonagem e expressão da proteína em sistema heterólogo, testou-se a eficácia da proteína codificada por cp1002_RS09720 de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* em vacinas de subunidade recombinante e de DNA. Este alvo vacinal foi predito como um dos melhores candidatos a vacinais por análise de densidade de epitopos maduros (MED). O gene cp1002_RS09720 foi clonado em dois vetores diferentes (pAE para vacina de subunidade e pTARGET para vacina de DNA). Quatro grupos de 15 camundongos foram imunizados com a proteína recombinante rCP09720 associada ao adjuvante de hidróxido de alumínio (G1), vacina de DNA pTARGET / cp09720 (G2), pTARGET (G3) e PBS como controle negativo (G4). A imunização ocorreu em duas doses intercaladas por um intervalo de 21 dias. Vinte e um dias após a administração da última dose, os animais foram desafiados com a estirpe virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6. O grupo G1 apresentou níveis elevados de IgG1 e IgG2a nos dias 21 e 42 após a imunização e um nível significativo de IFN- γ ($P < 0,05$), sugerindo uma resposta Th1. Os níveis de proteção obtidos foram de 58,3% e 16,6% para G1 e G2, respectivamente. Assim, a vacina da subunidade composta pela proteína recombinante rCP09720 com $Al(OH)_3$ é uma formulação antigênica promissora para ser utilizada como vacina contra o CLA.

Palavras-chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vacina de DNA, vacina de subunidade, cp1002_RS09720

Abstract

BRUM, Alexandre. **Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protect mice against challenge**. 2019. 54p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

We tested the efficacy of the esterase encoded by *cp1002_RS09720* from *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* in recombinant subunit and DNA caseous lymphadenitis (CLA) vaccines. This target was predicted as one of the best CLA vaccine candidates by mature epitope density (MED) analysis. The gene *cp1002_RS09720* was cloned into two different vectors (pAE for subunit vaccine and pTARGET for DNA vaccine). Four groups of 15 mice each were immunized with the recombinant esterase rCP09720 associated with aluminum hydroxide adjuvant (G1), pTARGET/*cp09720* as DNA vaccine (G2), a naked pTARGET (G3), or PBS as a negative control (G4). Immunization occurred in two doses intercalated by a 21-days interval. Twenty-one days after the last dose administration, animals were challenged with virulent *C. pseudotuberculosis* MIC-6 strain. The G1 group showed high levels of IgG1 and IgG2a on days 21 and 42 post immunization and a significant level of IFN- γ ($P < 0.05$), suggesting a Th1 response. Protection levels obtained were 58.3% and 16.6% for G1 and G2, respectively. Thus, the subunit vaccine composed by the recombinant esterase rCP09720 and Al(OH)₃ is a promising antigenic formulation to be used as vaccine against CLA.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, DNA vaccine, subunit vaccine, *cp1002_RS09720*.

Lista de Figuras

Figura 1. Análise em Western blot com anticorpo monoclonal anti-6xHis da proteína rCP09720	33
Figura 2. Imunofluorescência indireta de células CHO transfectadas com (A) pTARGET - controle (B) pTARGET/cp1957, usando anticorpo policlonal anti-rCP09720	34
Figura 3. Níveis de IgG1 (A) e IgG2a (B) induzidos por vacina recombinante e vacina de DNA usando gene CP09720 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	35
Figura 4. Expressão relativa de IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4, induzida em esplenócitos de Balb/C imunizados com vacina recombinante de subunidade e vacina de DNA usando gene CP09720 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e controles quantificados por real-time PCR.....	36
Figura 5. Curva de sobrevivência de animais imunizados com vacina recombinante e vacina de DNA após desafio com 10^4 CFU de cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos vacinais, dose e dias de coleta e imunizações.....	37
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	7
2.2. Epidemiologia	8
2.3. Diagnóstico e controle	9
2.3.1. Diagnóstico	9
2.3.2. Controle	11
2.3.2.1. Vacinas recombinantes	13
2.4. Reposta imune frente a antígenos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	17
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	19
3.1. Hipótese	19
3.2. Objetivo Geral	19
3.3. Objetivos Específicos	19
4. ARTIGO PUBLICADO	20
5. CONCLUSÃO GERAL	40
6. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma importante patologia, identificada pela primeira vez em 1888, que afeta principalmente ruminantes, causando importantes perdas econômicas e debilidade nos animais. A LC tem como agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram positiva, intracelular facultativa, que se instala nos linfonodos causando inchaço e nódulos, conhecida como mal do caroço. A infecção acontece pela contaminação de materiais de trabalho, como por exemplo, tesoura de tosa e também de forma natural quando há pequenas lesões na pele dos animais, que servem como porta de entrada para o patógeno, que tem no ambiente seu reservatório natural (Baird and Fontaine, 2007) (Windsor, 2011).

No Brasil, apresenta-se de forma endêmica com ocorrência de até 76% em Minas Gerais, 32,5% no Rio de Janeiro e 8% no Rio Grande do Sul, segundo Seyffert *et al.*, (2010).

O tratamento mais utilizado, após a infecção do animal, é feito com antibióticos. Por vezes pode ser ineficaz em função da formação de uma cápsula serosa no linfonodo, local de instalação da bactéria, a qual impede a chegada do princípio ativo. Além disso, pode representar elevado custo considerando o número de animais infectados (Costa *et al.*, 2011).

De qualquer forma a medida de melhor custo-benefício contra a introdução da LC nos rebanhos é a imunização, embora mostrado que 43% dos agricultores que aplicaram vacinas comerciais nos Estados Unidos em 2003, apenas 12% as usaram corretamente (Paton *et al.*, 2003).

A maioria das vacinas comerciais disponíveis no Brasil são constituídas de bacterinas com células vivas e são comercializadas desde o ano 2000 (Dorella *et al.*, 2006). Vacinas vivas podem causar a doença se não forem bem atenuadas e podem estimular a geração de uma grande diversidade de anticorpos. Tal diversidade pode não ser efetiva no momento da infecção para sinalizar o patógeno e facilitar a opsonização.

No contexto de produção de alternativas às vacinas convencionais para o controle de LC, o sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, nos últimos anos, possibilitou a identificação *in silico* de genes alvos para estudo, especialmente no uso em vacinas recombinantes como as de subunidades e de DNA (Pacheco *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2011; Dorella *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

Dentre esses alvos, o gene *cp1002_RS09720*, de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, que codifica para uma proteína potencialmente antigênica, predita pela metodologia MED, descrita a seguir, foi testada nesta tese como imunógeno em modelos murinos a fim de se

avaliar a resposta imune celular e humoral, seguido do teste de desafio.

A utilização do produto da expressão do gene por clonagem e expressão da proteína em sistema heterólogo e posterior purificação, associada ao adjuvante hidróxido de alumínio, bem como a construção de vetores de expressão em células de mamíferos, *pTARGET/09720*, que compõem a vacina de DNA foram utilizados neste experimento, aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da UFPel sob número 8835.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis, o agente etiológico da Linfadenite caseosa, é uma bactéria gram positiva, intracelular facultativa, não esporulante, fimbriada que exibe formas pleomórficas variando de cocóides a bastões filamentosos, paliçada ou em formato de letras chinesas.

Tal bactéria pertence ao grupo nomeado CMNR e inclui também além do gênero *Corynebacterium*, os *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Esse grupo é altamente heterogêneo, no entanto com características muito particulares, como: (i) uma organização específica da parede celular, caracterizada principalmente pela presença de um enorme complexo polimérico composto por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos e (ii) alto conteúdo de Citosina/Guanina (Dorella *et al.*, 2006).

A bactéria apresenta também variações fisiológicas e bioquímicas que diferenciam a espécie em dois biovars ovis e equi. Essa diferenciação é feita através da prova bioquímica de nitrato redutase, a mesma utilizada para classificar algumas micobactérias não tuberculosas, como o *M. kansasii*, Complexo *M. terrae* ou *M. szulgai*, os quais são nitrato-redutase positivos (Martin *et al.*, 2005).

No caso de *C. pseudotuberculosis*, o biovar ovis apresenta-se nitrato redutase negativa e o biovar equi, nitrato redutase positiva (de Sá Guimarães *et al.*, 2011; Windsor, 2011). No entanto, não dados sobre a correspondência deste teste para *C. pseudotuberculosis*, mas essa diferenciação pode indicar suscetibilidade e ou resistência a drogas, como utilizado para tuberculose.

C. pseudotuberculosis tem capacidade de colonizar o linfonodo e sobreviver ao ataque dos macrófagos por sua capacidade de rapidamente infectar o linfonodo, o que leva ao desenvolvimento da infecção e culmina em nódulos e abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e tecido subcutâneo (forma cutânea), ou nos gânglios linfáticos de órgãos internos (forma visceral), como pulmões, fígado e rins (Souza *et al.*, 2012).

2.2. Epidemiologia

A disseminação de LC ao redor do mundo provavelmente acontece pela importação de animais infectados. Importante destacar que é causa significativa de perdas econômicas e problemas de bem-estar animal em muitos países, pela redução no ganho de peso dos animais e na produção leiteira (Baird & Fontaine, 2007; Windsor, 2011).

Tais perdas têm sido demonstradas com importantes impactos na Oceania, África e América do sul (Ruiz *et al.*, 2011). No Brasil, alta prevalência tem sido relatada no estado de Minas Gerais em rebanhos de ovelhas, de até 75,8 %, sendo que nas fazendas onde ocorre, até 95,9 % dos animais estão infectados (Seyffert *et al.*, 2010).

A doença é zoonótica e a infecção amplamente disseminada em rebanhos de ovinos no estado de Minas Gerais e a falta de boas medidas de manejo e vacinação, permitem a transmissão deste agente infeccioso em toda a rede de produção (Guimarães *et al.*, 2011).

Farias *et al.*, (2019) relataram que no nordeste do Brasil, em um total de 2744 amostras de soro de cabra, de 230 fazendas, coletadas entre 2010 e 2012, as soroprevalências em nível de fazendas e em nível animal foram 87,8% e 30,3%, respectivamente, sugerindo que *C. pseudotuberculosis* é comum em rebanhos caprinos da região Nordeste.

Em parte, a alta taxa se estabelece pela elevada capacidade de *C. pseudotuberculosis* permanecer longos períodos viável no ambiente e por práticas de manejo de rebanho ineficientes e rudimentares (Guimarães *et al.*, 2011).

A fim de reduzir tais índices, deve-se atentar para a necessidade de estabelecer medidas de controle adequadas, como incisão e drenagem precoce de abscessos superficiais, quarentena dos animais e eliminação de abscessos de animais afetados, além de inspeção periódica do rebanho e a não introdução de animais infectados em rebanhos saudáveis, bem como a vacinação dos animais saudáveis (Bastos *et al.*, 2012; Windsor, 2011), concluindo-se que essas são as melhores práticas e estratégias para redução nos níveis de ocorrência e inclusive sua incidência zoonótica (Paton *et al.*, 2003; Peel *et al.*, 1997).

Por fim, alguns países não tem feito uma declaração oficial a OMS, incluindo o Brasil, o que torna difícil uma estimativa precisa dos reais níveis ocorrência (de Sá Guimarães *et al.*, 2011).

2.3. Diagnóstico e controle

2.3.1. Diagnóstico

Métodos diagnósticos para LC vem sendo desenvolvidos a muitos anos na tentativa de superar o problema dos animais com casos assintomáticos. Tais aplicações tentam indicar a presença da doença brevemente, a fim de que se tenham ações de controle imediatas para que a doença não se espalhe pelo rebanho.

Um dos testes comerciais disponíveis foi desenvolvido pela API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, da France. Esse teste consiste em um kit comercial onde são realizados 21 testes bioquímicos para identificação de uma série de microrganismos, e o resultado obtido entre 24 e 48 horas. No entanto pode parecer distante da realidade dos produtores sua aquisição e uso além de que, é um kit inespecífico, ou seja, para vários microrganismos.

Testes diagnósticos para LC estão sendo cada vez mais estudados, desde a década de 80, incluindo o teste da imunodifusão em gel, do teste da inibição da hemólise, do PCR – Reação em cadeia da polimerase (Burrell, 1980; Anderson & Nairn, 1984), e também diferentes ensaios de ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay.

Almeida *et al.*, (2017) realizaram ensaio de PCR quadruplex para espécies de *C. pseudotuberculosis* com 348 amostras, a fim de validar tal metodologia frente ao teste bioquímico de redução do nitrato. O teste não mostrou diferença significativa ($P = 0,75$) na confirmação de casos, em relação ao teste bioquímico de redução de nitrato.

ELISAs indiretos utilizando várias preparações, entre elas célula bacteriana, proteínas secretadas e a toxina PLD de *C. pseudotuberculosis* já foram estudados (Paule *et al.*, 2003; Binns *et al.*, 2007), também ELISA sanduiche com PLD (Dercksen *et al.*, 2000) e ELISA para detectar interferon gama (IFN- γ) como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* (Prescott *et al.*, 2002; Menzies *et al.*, 2004) a fim de tornar possível um teste rápido, sensível e barato.

Um ELISA indireto foi utilizado para detecção de imunoglobulinas específicas totais para antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* e alcançou 98,5% de especificidade e 93,5% de sensibilidade (Seyffert *et al.* 2010).

Rezende *et al.*, (2016) encontraram 90% de sensibilidade e 75,6% de especificidade em ELISA indireto usando proteína recombinante CP1002_0369 de *C. pseudotuberculosis*. Farias *et al.*, (2019) encontraram soroprevalências de 87,8% e 30,3%, em fazendas e caprinos, respectivamente, na região Nordeste usando a técnica de ELISA indireto.

Normalmente, os testes ELISA funcionam adequadamente em caprinos, mas com sensibilidade reduzida em ovelhas, especialmente em ovelhas infectadas subclanicamente apenas com abscessos interno. Sua especificidade também pode variar devido a reações cruzadas com espécies bacterianas relacionadas ou devido a presença de anticorpos herdados da progenitora.

Por fim, de forma clínica, a taxa de soropositividade em ovinos varia com a idade e estado imunológico e com a extensão da exposição a *C. pseudotuberculosis* e o intervalo entre a exposição e o diagnóstico (Sutherland *et al.*, 1987a;b).

2.3.2. Controle

Métodos de controle envolvem desde práticas de manejo adequadas, como retirada dos animais infectados do rebanho e isolamento, remoção dos abscessos por incisão e drenagem precoce de abscessos superficiais.

In vitro, *C. pseudotuberculosis* é sensível a antibióticos como penicilina e tetraciclina, contudo quando do tratamento *in vivo*, as bactérias estão protegidas no interior dos granulomas, o que reduz o nível de acesso dos antibióticos, devido a cápsula fibrosa ou à presença de pus o que torna o tratamento muitas vezes ineficaz (Moura-Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011).

Neste cenário, a melhor estratégia para controle de LC é a utilização de vacinas que previnem a infecção do animal e do rebanho.

Poucas são as vacinas disponíveis no mercado atualmente e algumas delas ainda sem licença em vários países (Ruiz *et al.*, 2011). Além disso, o preço por dose é alto (podendo chegar a R\$ 2,50 a dose, necessitando três doses por animal).

A vacinação é a única forma efetiva para prevenção e controle da Linfadenite caseosa, já que reduz a manifestação dos sintomas como os abscessos, que são a principal causa de contaminação ambiental e disseminação no rebanho quando de sua ruptura. Deve-se considerar no entanto que, as vacinas podem não ser efetivas no controle dos sintomas (Windsor, 2011; Piontkowski & Shivvers, 1998).

Claramente a vacinação, associada ao bom manejo do rebanho são as principais estratégias para o controle de LC, tendo em vista que a indução de altos títulos de anticorpos específicos pode ser limitante para o progresso clínico da doença, bem como, para a infecção (Guimarães *et al.*, 2011; Seyffert *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2007).

Moussa *et al.*, (2016) obtiveram valores iguais de títulos de anticorpos, para ovelhas vacinadas com as duas formas de apresentação dos biovars de *C. pseudotuberculosis*, biovar *ovi* e biovar *equi*.

Interessante ressaltar que, no mesmo experimento, búfalos não vacinados – grupo controle, apesar de apresentarem títulos de anticorpos, não desenvolveram lesões frente ao desafio, como os controles do grupo ovino não vacinado, os quais desenvolveram lesões típicas de LC, fato que indica a diferença na virulência da cepa em relação ao hospedeiro.

Desta forma, a composição e o tipo de hospedeiro, além de sua característica corporal por exemplo, no qual a vacina será utilizada são fatores preponderantes na escolha da mesma, já que geralmente a proteção incrementa com a dose, podendo-se entender que

há uma correlação diretamente proporcional entre a quantidade de antígeno aplicado e a proteção no caso de *C. pseudotuberculosis* (Brogden *et al.*, 1985).

Proteção dependente da concentração das doses de antígeno já foi observada, utilizando-se doses entre 133 e 500µg de parede celular de *C. pseudotuberculosis*, conferindo diferentes taxas de proteção e alterando o tempo de surgimento de sintomas característicos de LC em alpacas (Braga, 2007).

No Brasil, vacinas comerciais são compostas de bacterina atenuada da cepa 1002 – biovar *ovis* – como por exemplo a Glanvac ® 6 da empresa Zoetis. Glanvac ® 6 é uma vacina de componentes múltiplos contendo adjuvante incompleto de Freud's e antígenos ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis* (*ovis*), *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei* e sua indicação é apenas para ovinos e caprinos (Smith and Sherman, 2011), no entanto, foram encontrados baixos títulos de anticorpos, frente a fosfolipase D (PLD), um dos principais fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* (Fontaine *et al.*, 2006).

Já a vacina Linfovax, da Vencofarma é composta apenas pela cepa 1002, atenuada, liofilizada contendo no mínimo 5 e no máximo 60 bilhões de bactérias viáveis, por dose de 1mL, número bastante variável que pode tornar a vacina não efetiva principalmente para hospedeiros ruminantes de grande porte.

Tais vacinas continuam sendo usadas, no entanto os índices de ocorrências continuam elevados. De forma geral, a busca no desenvolvimento de novas vacinas tende a identificar alvos vacinais conservados entre grupos ou espécies que possam ser utilizados como fator antigênico em uma única vacina, o que traria uma proteção múltipla com antígenos específicos.

Essa abordagem é possível através da vacinologia reversa, que se utiliza de informações presentes nos genomas para identificar genes alvo específicos que compõem as vacinas recombinantes.

2.3.2.1. Vacinas recombinantes

Atualmente, o sequenciamento de genomas e as ferramentas de bioinformática foram capazes de promover avanços significativos nos últimos anos, os quais permitiram a compreensão de processos e estruturas celulares de diversos seres vivos.

Entre esses esclarecimentos, o entendimento genômico, pan-genômico, que descreve todos os genes e as variações genéticas entre espécies e também permite identificar genes presentes em diferentes linhagens de uma mesma espécie, e dentre esses os fatores de virulência, tem proporcionado avanços significativos na vacinologia (Pacheco *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2011; Dorella *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

Tais ferramentas tem facilitado a caracterização e identificação de diversos genes, os quais seus produtos proteicos permitem abordar novas estratégias vacinais como a vacinologia reversa, que se utiliza de informações presentes nos genomas para identificar genes que codificam para proteínas exportadas ou de membrana, possíveis agentes de um primeiro contato com o hospedeiro (Sette & Rappuoli, 2000).

A obtenção de produtos de sua expressão em sistemas heterólogos diversos, que possam ser usados como antígeno proporciona o desenvolvimento de vacinas a partir de informações presentes no genoma, sem a necessidade de se cultivar os microrganismos específicos (Sette & Rappuoli, 2000).

Tal abordagem proporcionou o desenvolvimento de vacinas chamadas recombinantes, sejam elas vacinas de DNA ou vacinas de subunidade.

Alguns autores indicam as vacinas de subunidade como a mais promissora dentre as novas abordagens vacinais, já que é incapaz de gerar a doença e pode ser antígeno comum para mais de um microrganismo, desde que o gene seja conservado filogeneticamente (Costa *et al.*, 2011; D'Afonseca *et al.*, 2008).

Soares *et al.*, (2012) identificaram 49 proteínas possivelmente antigênicas em 3 cepas de *C. pseudotuberculosis* por meio de vacinologia reversa.

A compreensão genética e molecular leva ao conhecimento dos principais fatores de virulência, como a fosfolipase D – PLD, a CP40, uma endoglicosidade de *C. pseudotuberculosis* (Droppa-Almeida *et al.*, 2016), entre outros também utilizados para o desenvolvimento de testes diagnósticos e como alvos vacinais (Rezende *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011; D'Afonseca *et al.*, 2011; Solanet *et al.*, 2011; Trost *et al.*, 2010).

Alvos vacinais são preferencialmente genes conservados entre grupos ou espécies, como no caso do grupo ao qual pertence *C. pseudotuberculosis* (CNMR) no qual estão presentes também além deste os gêneros *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*.

A expressão desses genes, após preditos, deve preferencialmente traduzir proteínas de membrana, expostas na superfície ou excretadas, como enzimas, por exemplo.

Pode-se considerar, que caso sejam conservados filogeneticamente podem ser alvos vacinais efetivos a mais de uma espécie do gênero, bem como bactérias patogênicas de outras espécies (Santana-Jorge *et al.*, 2016) ou sorovares diferentes como no caso de *Leptospira interrogans* que apresenta grande diversidade de sorovares (Seixas *et al.*, 2007). Para *C. pseudotuberculosis* foram encontrados 20 alvos comuns a todas as cepas e outras espécies do grupo CMNR (Barh *et al.*, 2011).

Seguindo a abordagem da genômica comparativa, usando caprinos, ovinos e bovinos como hospedeiros, foram identificados 76 possíveis alvos comuns as cepas Cp1002 e CpC231 de *C. pseudotuberculosis*. Quando incluída a cepa CpFrc41, o número de alvos comuns reduziu para 56. Todas as proteínas hipotéticas presentes em Cp1002 estavam ausentes em CpC231. Da mesma forma, 13 e outros seis alvos, respectivamente, presentes em Cp1002 estão ausentes em CpFrc41, o que demonstra a diversidade entre cepas e a necessidade de identificar alvos comuns no desenvolvimento de uma vacina universal para combate da Linfadenite caseosa (Barh *et al.*, 2011).

Araújo *et al.*, (2019) selecionaram candidatos vacinais a partir de análise *in silico*, dentre tantas metodologias, uma foi a definida como MED (Mature Epitopes Density) que tem como resultado a densidade de epítomos maduros ou concentração de epítomos maduros por sequência.

Essa metodologia é descrita por Santos *et al.*, (2012) cuja avaliação considera proteínas secretadas, potencialmente expostas na superfície e proteínas transmembrana, foco pelo qual é utilizado, já que estas podem interagir mais diretamente com as células do hospedeiro durante a infecção. A análise MED consiste em uma lista de proteínas exportadas (secretadas ou potencialmente expostas na superfície bacteriana) classificadas por valores descendentes de escore MED. O escore MED é calculado para cada sequência de aminoácidos de acordo com a equação descrita por Santos e colaboradores (2012) e representa a concentração de epítopo predita por sequência, em unidades nanomolares por Mer (nM/Mer).

Raynal *et al.*, (2018) citaram que os avanços dos últimos anos para identificar alvos vacinais em proteoma e exoproteoma podem não refletir o repertório de proteínas expressa

durante a infecção, sem investigar também proteínas de membrana. Para tal caracterizaram 22 proteínas de membrana, das quais 11 são desconhecidas e da outra metade, 4 foram apontadas como fatores de virulência e possíveis alvos vacinais.

Tais metodologias tendem a desenvolver vacinas que contribuam para a redução das infecções por *C. pseudotuberculosis*, a fim de proporcionar mais efetividade no controle da doença tornando-se alternativas mais efetivas e baratas que as formas clássicas.

Dentre as vacinas clássicas estão inclusas as vacinas atenuadas e inativadas com cepas de *C. pseudotuberculosis*, inclusive mutantes e também antígenos dos sobrenadantes das culturas (Meyer *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 1998).

Vacinas inativadas podem exibir efeitos colaterais já que o patógeno pode ser ativado e causar infecção (Santana-Jorge *et al.*, 2016; Araújo *et al.*, 2019). Algumas vacinas disponíveis estão baseadas em cultura inativada com formalina e acrescida de fosfolipase D recombinante, no entanto seus níveis de proteção variam conforme o hospedeiro e a região, devido às variações genéticas do patógeno (Santana-Jorge *et al.*, 2016).

A fosfolipase D (PLD) é apontada como o maior fator de virulência para *C. pseudotuberculosis* por aumentar a permeabilidade vascular e causar danos no tecido epitelial contribuindo para a disseminação da bactéria. Hodgson *et al.*, (1990) foram os primeiros a clonar, caracterizar e expressar o gene de PLD.

Cabras vacinadas com PLD mais bacterina, seguido de vacinados somente com PLD apresentaram maior produção de ânion superóxido responsável pela estimulação de macrófagos, no entanto a maior produção de linfócitos foi mostrada no grupo que recebeu apenas a fosfolipase D (Syame *et al.*, 2018).

Leal *et al.*, (2018) utilizando modelo experimental BALB/c, desenvolveram estratégia vacinal usando BCG (Bacillus Calmette-Guérin) expressando a proteína PLD de *C. pseudotuberculosis* e obtiveram índice de proteção de 88% frente a desafio com cepa virulenta MIC-6. Já Silva *et al.*, (2017) obtiveram 30% de proteção utilizando rPLD associada a saponina e um incremento de 10% na proteção quando a rPLD foi associada a proteína rCP09720.

Outra interessante estratégia foi desenvolvida por Ribeiro *et al.*, (2014) com o uso como vacina de cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* deficiente na aquisição de ferro, fundamental para a sobrevivência do patógeno durante a infecção. Tais autores relatam sobrevivência de 80% após desafio com cepa virulenta.

A endoglicosidade de *C. pseudotuberculosis*, conhecida como CP40 também tem sido apontada como fator de virulência. Silva *et al.*, (2014) obtiveram 90% de proteção usando

rCP40 como vacina em modelos experimentais. Já em estudo mais atual com a proteína CP40, foi obtido 100% de proteção contra desafio com cepa virulenta (Droppa-Almeida *et al.*, 2016b).

A proteína CP40 é usada como padrão para definição de epítomos imunodominantes. Foram obtidos epítomos com 6 seqüências entre 10 e 16 resíduos de aminoácido, apontado como tamanho ideal para a ligação na abertura da molécula de MHC II. A escolha da predição do epítopo mapeado de MHC II é devido ao sentido da resposta imune, que conduzirá à ativação dos linfócitos de TCD4 +, importante para a ativação de linfócitos de T e B (Droppa-Almeida *et al.*, 2018; Shadnezhad *et al.*, 2016).

Estudos que considerem a interação da proteína com os receptores são necessários para entender os mecanismos de virulência da proteína. Droppa-Almeida *et al.*, (2018) fizeram a predição da interação de vacinas e o receptor TLR2, a fim de ter certeza de que o antígeno vacinal seria reconhecido pelos receptores específicos da célula apresentadora de antígeno e após a ativação, promover respostas imunes, inatas e ativar a resposta imune adaptativa. Portanto, neste estudo, as áreas hidrofóbicas da proteína CP40 e seus respectivos epítomos imunodominantes interagiram com TLR2, relação que desempenha um papel importante na ativação da resposta imune.

Outra estratégia que vem sendo bem estudada são as vacinas de DNA, que promovem a expressão da proteína usando a maquinaria celular do hospedeiro. No entanto em alguns casos pode acontecer de haver dificuldade na expressão da proteína em relação às diferenças fundamentais entre genes procarióticos e eucarióticos (por exemplo, uso do Codon) e produtos do gene (por exemplo, devido à maquinaria celular diferenciada), conduzindo à má expressão ou a conformação, ao final da expressão da proteína, que acontece de forma incorreta (Chaplin *et al.*, 1999).

Vetores de expressão para vacinas de DNA como pTARGET e pVAX1 foram utilizados na tentativa de obter proteção em modelos BALB/c contra desafio com cepas virulentas de *C. pseudotuberculosis*, no entanto, com baixos níveis de proteção (Brum *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2011).

2.4. Reposta imune frente a antígenos de *C. pseudotuberculosis*

Respostas imunes TH1 são apontadas como efetivas contra *C. pseudotuberculosis*. Segundo Vale *et al.*, (2016) mostraram que camundongos BALB/c infectados com diferentes quantidades de *C. pseudotuberculosis* apresentam diferentes níveis de IgG, sendo a subclasse IgG2a a predominante ao longo de 120 dias de experimento sem mostrar diferenças na produção de IFN- γ e com baixos níveis de IL-4, característico de uma resposta Th1. Elevada produção de interleucina 12 (IL-12) também foi detectada na estimulação de esplenócitos. A IL-12 é produzida na apresentação de antígenos aos linfócitos T, direcionado uma resposta Th1.

Silva *et al.*, (2017) também encontraram perfil de resposta Th1 usando proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* preditas através da metodologia MED, associado a PLD e adjuvante saponina.

Leal *et al.*, (2018) expressando a proteína PLD de *C. pseudotuberculosis* em BCG (Bacillus Calmette-Guérin) demonstraram que a produção de IgG total não foi significativa entre os grupos nos dias 0 e 21. No entanto, *M. bovis* BCG / pld demonstrou aumento na produção total de IgG quando comparado aos outros grupos e níveis IFN- γ e IL-10 foram detectados. Sabe-se que a IL-10 também desempenha um papel importante no bloqueio da produção de citocinas, sugerindo que a IL-10 pode controlar a síntese de IFN- γ durante a infecção, evitando assim a reatividade excessiva Th1.

Brum *et al.*, (2017) em experimento com animais BALB/c usando proteína recombinante de *C. pseudotuberculosis* como antígeno, administrado com hidróxido de alumínio como adjuvante, o qual já era indicado como tendo efeito positivo por Cameron e Bester (1984), obtiveram 58,3% de proteção para desafio heterólogo, bons níveis de expressão de IFN- γ , importante para o controle da infecção inicial e altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a, corroborando o direcionamento da resposta imune frente a esse patógeno como Th1. Tais autores também testaram para o mesmo gene uma vacina de DNA, em vetor pTARGET, obtendo baixo índice de proteção.

Costa *et al.*, (2011), indicam elevados títulos de anticorpos IGg1 e IGg2a. Observando a razão entre os títulos destes dois isotipos, os autores indicaram o direcionamento de uma resposta Th2 estimulada pelo vetor usado nessa abordagem vacinal de vacina de DNA.

No entanto, a eficácia da vacina de DNA em ovinos é fortemente influenciada pela via de vacinação. Entre grupos vacinais, os que receberam doses intramusculares em vez de intraperitonal, tiveram respostas IgG2 significativamente elevadas comparadas aos animais

não vacinados, sendo que ambos os subgrupos tiveram níveis equivalentes de IgG1. Isso sugere que a presença de anticorpos IgG2 e, portanto, uma resposta semelhante a Th1, induzida pela vacina de DNA, deu origem a imunidade protetora contra *C. pseudotuberculosis* (De Rose *et al.*, 2002).

A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (Machado *et al.*, 2004).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

A utilização do gene Cp1002_RS09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* usado como vacina de DNA e vacina de subunidade protege camundongos Balb/C frente ao teste de desafio com cepa virulenta MIC-6.

3.2. Objetivo Geral

Desenvolvimento e avaliação de vacinas recombinantes para o controle de LC;

3.3. Objetivos Específicos

- Obter vetores recombinantes (pTARGET e pAE) expressando o gene Cp1002_RS09720 de *C. pseudotuberculosis*;
- Produzir uma vacina a partir da proteína recombinante Cp1002_RS09720 purificada;
- Avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c tratados (imunizados) com as vacinas recombinantes de DNA e subunidade;
- Avaliar a eficácia das vacinas através de desafio heterólogo com cepa virulenta;

4. Artigo publicado

Title: Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and Subunit recombinant vaccines partially protect mice against challenge

Brum, A.A., Rezende, A. de F.S., Brilhante, F.S., Collares, T., Begnine, K., Seixas, F.K., Collares, T. V., Dellagostin, O.A., Azevedo, V., Santos, A., Portela, R.W., Borsuk, S., (2017). Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microbiol.* 66,pp. 635–642.

Journal of Medical Microbiology

ISSN: 0022-2615 (print); 1473-5644 (web)

Fator de impacto: 2.112

Qualis Biotecnologia: B1

Title: Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and Subunit recombinant vaccines partially protect mice against challenge

Short title: recombinant vaccines for CLA partially protect mice against challenge

Alexandre Antunes Brum¹; Andréa de Fátima Silva Rezende¹; Francisco Silvestre Brilhante¹; Thais Collares¹; Karine Begnine²; Fabiana Kommling Seixas², Tiago Veiras Collares²; Odir Antônio Dellagostin³; Vasco Azevedo⁴; Anderson Santos⁵; Ricardo Wagner Portela⁶; Sibele Borsuk^{1*}

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

²Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brazil, 96010-900

³Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brazil, 96010-900

⁴Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, 31270-901

⁵Faculdade de Computação, UFU, Uberlândia, MG, Brazil, 38400-902 ⁶Laboratório de ⁶Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, BA, Brazil, 40110-100.

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

Abstract

Purpose: Here, we tested the efficacy of the esterase encoded by *cp1002_RS09720* from *C. pseudotuberculosis* in recombinant subunit and DNA caseous lymphadenitis (CLA) vaccines. This target was predicted as one of the best CLA vaccine candidates by mature epitope density (MED) analysis. **Methodology:** Gene *cp1002_RS09720* was cloned into two different vectors (pAE for subunit vaccine and pTARGET for DNA vaccine). Four groups of 15 mice each were immunized with the recombinant esterase rCP09720 associated with aluminum hydroxide adjuvant (G1), pTARGET/*cp09720* DNA vaccine (G2), a naked pTARGET (G3), or PBS as a negative control (G4). Immunization occurred in two doses intercalated by a 21-days interval. Twenty-one days after the last dose administration, animals were challenged with virulent *C. pseudotuberculosis* MIC-6 strain. **Results:** G1 showed high levels of IgG1 and IgG2a on days 21 and 42 post immunization and a significant level of IFN- γ ($P < 0.05$), suggesting a Th1 response. Protection levels obtained were 58.3% and 16.6% for G1 and G2, respectively. **Conclusion:** The subunit vaccine composed by the recombinant esterase rCP09720 and $Al(OH)_3$ is a promising antigenic formulation to be used as vaccine against CLA.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, DNA vaccine, recombinant subunit vaccine.

Introduction

Corynebacterium pseudotuberculosis, the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats, is a gram-positive, aerobic and facultative intracellular bacteria that preferably infects macrophages [1]. This bacterium affects a wide variety of hosts, including small ruminants, cows, horses, wild animals [2], and can even infect humans, through the contamination of meat and milk and the infection of veterinarians and farm practitioners [3]. It is a worldwide distributed chronic and subclinical disease, with high prevalence in developing countries [4], and has been pointed as one of the main causes of economic losses in Africa and South America [5]. CLA treatment is not effective because the bacteria is located inside encapsulated pyogranulomas and cannot be reached by antibiotics [6].

Vaccination is the most important approach for CLA control since animals are refractory to therapeutics, due to antibiotics inability to reach the bacteria inside the abscesses [7]. Several vaccination strategies have been proposed, including inactivated or attenuated *C. pseudotuberculosis* strains and native antigens from culture supernatants [5, 8–10]. One of the most studied vaccinal targets is phospholipase D (PLD), a major *C. pseudotuberculosis* virulence factor, that is responsible for its dissemination in the host and demonstrated to have partial protection when used as a vaccine in some animal models [11, 12]. CLA commercial vaccines are based on attenuated strains of *C. pseudotuberculosis* and are not able to fully protect susceptible animals, cannot be used in all host species, present low efficacy in goats, and are not licensed for use in many countries [7]. Additionally, side effects are associated with commercially available vaccines such as fever, malaise, reductions in milk production and distribution of lesions, being more intense in goats [7, 9].

C. pseudotuberculosis genome sequence analysis provided critical data necessary to elucidate the molecular and genetic basis of this bacterium's virulence, and is also useful to predict new vaccine targets [13–16]. This approach allowed the development of new DNA and recombinant subunit

vaccines based on recently discovered antigenic targets [17, 18]. Few recombinant antigens have been tested as immunogens against *C. pseudotuberculosis* infection, with limited success [18–20].

Esterase, encoded by the *cp1002_RS09720* gene, recently reannotated (old tag-*cp1002_1957*), was first predicted as a potential vaccine target in a pan-secretome study of *C. pseudotuberculosis* 1002 and C231 strains [21]. Through the Mature Epitope Density (MED) analysis, a computational strategy based on measuring epitopes concentration in a mature protein, this protein was ranked as one of the best targets to be used in CLA vaccines or diagnosis trials [21]. In fact, the recombinant esterase rCP09720 was used in an ELISA-based system with the objective to detect the infection by *C. pseudotuberculosis* in sheep, presenting satisfactory levels of specificity and sensitivity [22]. Despite its importance, this target has never been used in vaccine formulations before. Here, we assessed the potential of the recombinant esterase as DNA and subunit vaccine against *C. pseudotuberculosis* infection in a murine model. Still, humoral and cellular immune responses induced by recombinant vaccines were characterized.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The sequenced strains of *C. pseudotuberculosis* 1002 [23] and MIC-6 strains (already sequenced, currently at the annotation and assembly phases -personal communication), *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), and *E. coli* BL21 Star (Invitrogen) cells were used in this study. *C. pseudotuberculosis* strains were cultivated in Brain Heart Infusion broth (BHI, Acumedia) supplemented with 0.5% Tween 80 at 37 °C for 72 h in a shaker at 200 rpm, or in BHI Agar 1.5% [24]. *E. coli* strains were grown in LB medium (Luria-Bertani) or LB Agar 1.5% for 16 h at 37 °C. When necessary, LB medium was supplemented with ampicillin 100 µg/mL.

Cloning of *cp1002_RS09720* gene from *C. pseudotuberculosis*

Amplification of *cp1002_RS09720* gene was performed as already described [25] using primers F5' ACC ATG GGG CCT CGC GAC TGG CTG CGC 3' and R5' CCG GAA TTC TTA CCA GGC GTT CAT AAC GT 3', designed based on the *C. pseudotuberculosis* 1002 sequence (GenBank accession WP_013242814.1) using Vector NTI 10 software (Invitrogen). For PCR, 50 ng of *C. pseudotuberculosis* strain 1002 genomic DNA was added to 10 µM of each primer and PCR Mastermix (Promega) in a final volume of 50 µL. PCR product was visualized in 1% agarose gel stained with Blue Green (LGC Biotechnology). Gene *cp1002_RS09720* was cloned into pAE plasmid [26]. Thus, pAE vector and *cp1002_RS09720* gene were digested with the restriction enzymes *Bam*HI and *Eco*RI (Invitrogen), and ligation was performed using T4 DNA ligase (Invitrogen). The pAE/*cp09720* recombinant clone was characterized by restriction enzyme digestion and DNA sequencing.

For DNA vaccine construction, *cp1002_RS09720* gene was amplified using the primers F5' ACC ATG GGG CCTC GCG ACT GGC TGC GC and R5' CCG GAA TTC TTA CCA GGC GTT CAT AAC GT 3'. Primers were designed based on the *C. pseudotuberculosis* 1002 sequence (GenBank accession NC_017300.1) using Vector NTI 10 software (Invitrogen). The amplicon was inserted into the pTARGET vector (Promega) following the manufacturer's instructions. Recombinant vectors were selected with 100 µg/mL of ampicillin and X-Gal (20 mg/mL - Invitrogen). The recombinant vector was denominated pTARGET/*cp09720*.

Expression and purification of recombinant protein rCP09720

The expression and purification of rCP09720 were performed as already described [25]. Briefly, plasmid pAE/*cp09720* was inserted in *E. coli* BL21(DE3) Star. Isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG, 1 mM) was added to induce protein expression in an orbital shaker at 37°C for 3h. Expression of rCP09720 was confirmed by Western blotting using a peroxidase conjugated monoclonal antibody against 6xhistag (Sigma). Nickel affinity chromatography performed purification on a sepharose

column (HisTrap™, GE Healthcare). Purity level was determined by 12% SDS-PAGE and protein concentration using a commercial kit based on the bicinchoninic acid (BCA) methodology (Pierce).

***In vitro* transfection of CHO cells with DNA vaccine**

CHO (Chinese hamster ovary) cells were transfected with DNA from pTARGET/cp09720 or the naked pTARGET to confirm *in vitro* protein expression. CHO cells were cultivated on polystyrene 96 well plates (Nunc) using Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) media as previously described [27]. After an 80% confluence, cells were transfected using 1 µg of pTARGET/cp09720 or pTARGET and 1 µL of lipofectamine™2000 (Invitrogen). After 48 h of incubation, protein expression was evaluated using immunofluorescence assay (IFA). Polyclonal antibodies directed against the rCP09720 protein (1:100) and rabbit anti-mouse antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich) diluted at 1:80 were used for IFA.

Experimental animals and ethical aspects

BALB/c mice (6–8-week-old) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas, where the immunization assay was also conducted. All mice were kept in cages containing wood shavings, bedding and free access to water and a maintenance diet ad libitum in a 12-hour light/dark cycle, at room temperature at 21 ± 2 °C. All experiments were performed in compliance with the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEAA) of Pelotas Federal University (UFPel) approved the project (approval number 2442). All efforts were made to maximize animals' welfare.

Vaccination and challenge

BALB/c mice (6-8 weeks old) were divided into 4 groups of 15 mice each. Animals were immunized with two doses intercalated by 21-day intervals. Groups were distributed as follows: G1, inoculated via subcutaneous (s.c.) with 50 µg of rCP09720 associated with Al(OH)₃ (Aluminium hydroxide) at 15%; G2, inoculated via intramuscular (i.m.) with 50 µg of DNA vaccine pTARGET/cp09720; G3, inoculated via i.m. with naked pTARGET; and G4, control, inoculated via s.c. with PBS. Blood samples were collected by retro-orbital plexus puncture on days 0, 21 and 42 after the first immunization. Twelve mice per group were challenged intraperitoneally 21 days after the last immunization with 10⁴ CFU (i.p.) of *C. pseudotuberculosis* MIC-6 virulent strain [20]. Then, mice were monitored daily for 30 days, and deaths were recorded. The protocol of DNA vaccination was performed according to [18] and subunit vaccine according [28].

Assessment of humoral immune response

IgG1 (related to a Th2 cellular response) and IgG2a (related to a Th1 cellular response) levels in individual mice sera samples were determined by indirect ELISA, as previously described [29] with minor modifications. High binding polystyrene 96 well plates (Maxisorp, Nunc) were coated with 100 ng/well of the rCP09720 recombinant protein (1µg/mL) diluted in bicarbonate-carbonate buffer (pH = 9.6) for 16 h at 4°C. After that, plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Noncoated binding sites were blocked with 100 µL/well of 5% skimmed milk diluted in PBS for 1 h at 37°C. Sera samples were diluted 1:100 in PBS-T and incubated for 1 h at 37° C and washed three times with PBS-T. Then, 100 µL/well of goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Sigma-Aldrich) were added (1:4000) for 1 h at 37°C and washed five times with PBS-T. Then, rabbit anti-goat IgG conjugated with horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted in PBS-T (1:6000) was added. After incubation for 1 h at 37° C, plates were then washed five times with PBS-T. Colorimetric reaction was obtained using substrate-chromogen solution (*o*- phenylenediamine dihydrochloride; OPD tablets,

(Sigma-Aldrich) in 0.4 mg/mL phosphate-citrate buffer containing 0.04% of 30% hydrogen peroxide (pH=5.0). Plates were incubated at room temperature in the dark for 15 min. The reaction was stopped by adding 25 μ L of 4N H₂SO₄. Absorbance values were obtained on ELISA plate reader (Mindray) set at 450 nm. Each sample was tested in duplicate. The best dilutions for sera and conjugate and antigen concentration were achieved by a previous checkerboard titration.

Assessment of cellular immune response

Cellular immune response evaluation was performed as previously described by *C. pseudotuberculosis* research protocols in mice models [30], with some modifications. Briefly, at 21 days from the last immunization, three mice from the groups G1, G2 and G4 were sacrificed, and the spleen removed for splenocytes isolation. Spleen cell suspensions obtained from each animal were placed in complete RPMI medium (RPMI 1640 medium - Gibco BRL, supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml of streptomycin - LGC Bio), counted in a Neubauer chamber, and cell concentration was adjusted to 2×10^6 cells/mL. Viability was assured by exclusion with Trypan Blue staining (Vetec). Splenocytes were cultivated in triplicate into 24-well plates (Techno Plastic Products) containing 2×10^5 cells (100 μ L) per well. Cells were stimulated with sterile PBS (negative control), 15 μ g/mL of the recombinant protein rCP09720, or 8 μ g/mL of concanavalin A (ConA) mitogen (positive control). Plates were incubated with 5% CO₂ at 37° C for 72 h (maximum). Splenocytes were then collected and submitted to total RNA extraction with Trizol (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. Synthesis of cDNA was performed with 1 μ g of total RNA using the *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems). The cDNA was used for quantification of the expression profile of the cytokines IL-4, IL-10, IL-12, and IFN- γ by real-time PCR using the Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies), and Syber Green reagent (Applied Biosystems). Primers sequences used were F5'CCA AGG TGC TTC GCA TAT TT3' and

R5'ATC GAA AAG CCC GAA AGA GT 3' for IL-4 [31] F5'TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA3' and R5'ACAGGGGAGAAATCGATGACA 3' for IL-10 [32], F5' AGCACCAGCTTCTTCATCAGG 3' and R 5' CCTTTCTGGTTACACCCCTCC 3' for IL-12 [32], F5'GCGTCATTGAATCACACCTG3' and R5' TGAGCTCATTGAATGCTTGG 3' for IFN- γ [31]. The results were normalized using GPDH gene using the primers F5' AACGACCCCTTCATTGAC3' and R5' TCCACGACATACTCAGCAC 3', as previously described [33].

Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) and analyzed using GraphPad Prism, version 5, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical differences among groups for IgG1 and IgG2a levels and cytokines expression were determined using one-way ANOVA followed by the Tukey post-test. Fisher's test and log-rank test were used to determine significant differences in mortality and survival rates, respectively. Data were considered statistically different when the *p*-value was 0.05 or less.

Results

Recombinant vaccines

Recombinant esterase rCP09720 from *C. pseudotuberculosis* was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Star strain. The resultant yield after purification and refolding was 6 mg/L of the recombinant protein. Expression was confirmed by Western blot analysis using a monoclonal (Mab) anti-6xHis antibody (Figure 1). DNA vaccine and control plasmid (pTARGET/cp09720 and pTARGET) were used to transfect CHO cells to assess *in vitro* CP1957 expression (Figure 2). *In vitro* expression of the CP1957 protein was confirmed by IFA and the clone with more intense fluorescence were selected as DNA vaccine.

Humoral immune response induced in immunized mice

Recombinant protein-based vaccine rCP09720/Al(OH)₃ (G1) induced the highest levels of IgG1 and IgG2a, as shown in Figure 3. G1 was capable of inducing a significantly higher ($p < 0.05$) production of IgG1 (Figure 3A) and IgG2a (Figure 3B) when compared to all other groups (G2, G3, and G4) on days 21 and 42 after immunization

Cellular immune response evaluation

Cellular immune response was assessed by transcription levels of genes that encode the cytokines IL-4, IL-10, IL-12, and IFN- γ (Figure 4). Results showed that G1 and G2 were able to induce significant increase levels of IFN- γ expression when compared to the G3 and G4 control groups ($p < 0.05$). However, G1 presented the highest levels of IFN- γ mRNA (Figure 4A). No significant levels of IL-12, IL-10 and IL-4 were observed in G1 and G2 groups when compared to G4 control group, and no significant statistical differences were also observed when G1 and G2 were compared (Figure 4B, 4C, and 4D).

Protective potential of recombinant esterase

Immunization with rCP09720/Al(OH)₃ (G1) partially protected animals against infection with *C. pseudotuberculosis* MIC-6 strain ($p < 0.05$), resulting in a protection rate of 58.3% (Figure 5). Regarding DNA vaccine, G2 immunized with pTARGET/cp09720 showed a lower protection rate (16.6%, $p > 0.05$), despite the increased survival rate about G3 or G4. All the animals of negative control groups (G3 and G4) died. No side effects, tissue damage or any modification of animals' health conditions due to the vaccination protocol or even due to the vector herein used was observed.

Discussion

To our knowledge, this is the first work to describe the use of *cp1002_RS09720* gene from *C. pseudotuberculosis* in recombinant subunit and DNA vaccines. The gene was recently described as an

immunogenic target, with a high number of epitopes in mature protein by MED approach [22]. It is important to highlight that *cp1002_RS09720* is a highly conserved gene, presenting 100% identity among 31 sequenced strains of *C. pseudotuberculosis* [34], which makes it an excellent target for vaccines in field conditions.

Here, the formulation based on rCP09720 associated with $\text{Al}(\text{OH})_3$ was able to confer significant protection level ($p < 0,05$) against the challenge with the *C. pseudotuberculosis* MIC-6 virulent strain. The protective potential in G1 was associated with the highest levels of IgG1 and IgG2a, significant production of $\text{IFN-}\gamma$ and low biological levels of IL-4 and IL-10, a situation that points to an activation directed to the Th1 cellular immune profile. Aluminum hydroxide is the more used adjuvant for vaccine formulations, well known for a Th2 significant activation and induction of high levels of antibody production [35]. However, in some cases aluminum hydroxide can drive to a Th1 response in mice models, depending on the antigen employed at the vaccine design [36]. In this study, we could observe the last situation, since a significant increase in specific IgG1 production (associated with a Th2 response in mice) was observed [37]. Others adjuvants also were used in CLA vaccine formulation [3]. For example, levamisole, which is known for inducing a T helper type 1 response, was used in combination to a toxoid vaccine [38]. A study was carried out to examine the combined effect of vaccination with a commercial vaccine, and the results showed that the zinc-combined vaccine, as well as a washed antiseptic, were safe for ewes [39]. The MDP (Muramyl Dipeptide), an immune stimulant of the reticuloendothelial system, was used in association with low and high doses of crude bacterial antigens, cell wall, and toxin. The authors conclude that the vaccines composed of high dose of *C. pseudotuberculosis* toxin associated to MDP have shown to induce protective immunity in alpacas challenge with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain [40]

Despite partial protection (58.3%) of rCP09720/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ vaccine formulation, it should be considered that few studies were conducted to develop a recombinant subunit vaccine for CLA, and most had shown lower and intermediate rates. The use of rHSP60 did not protect mice against a virulent

C. pseudotuberculosis challenge [18, 41]. Still, just 44% of sheep immunized with genetically inactivated PLD were protected against CLA [11]. Recombinant serine protease of 40 kDa (rCP40) associated with saponin was able to protect 90% of mice challenged [20]. When rCP40 was related to Freund's adjuvants, 100% of animals were protected after challenge. However 60% of animals immunized with the control Freund's adjuvants survived [42].

The use of pTARGET/cp09720 as a DNA vaccine was not able to confer significant protection (16.6% protection rate, $p > 0.05$) and to induce IgG1 or IgG2a production. However, immunization with pTARGET/cp09720 induced IFN- γ significant production ($p < 0.05$), which can be associated with the rate of protection. DNA vaccine is known to induce Th1 cellular response mainly by the induction of IFN- γ production by CD4⁺ Th1 lymphocytes and CD8⁺ cytotoxic T cells [37, 43].

Previous studies described DNA vaccines as less effective than conventional or protein subunit vaccines in protecting against infection when considering some specific pathogen models, probably due to a weak and short-term immunity elicited [1, 44]. So far, just two targets were assessed in DNA vaccines against *C. pseudotuberculosis* [45]. *hsp60* DNA vaccination in mice was not able to induce protection [18], but when a genetically detoxified phospholipase D (Δ PLD) was targeted as a CTLA-4 fusion protein, vaccination provided a 70% protection level [45]. In our study, pTARGET/cp09720 was not able to induce a specific immune response nor a significant protection against CLA in mice, and maybe a technique aiming to target proteins to APC could be capable of raising the immune potential of DNA vaccines with rCP09720 as well.

The subunit and DNA recombinant vaccines have been developed in an attempt to improve the efficacy of CLA vaccine. The route of administration is important when these kinds of vaccines are used. For example, [46] had already tested and proved the superiority of i.m. via compared to s.c. in inducing a strong memory response and sterile immunity following challenge with *C. pseudotuberculosis* through the use of a plasmid encoding PLD antigen linked to CTLA4-Ig. However,

the subcutaneous route is the most utilized in all kinds of CLA vaccine (toxoid, bacterin, subunit recombinant and DNA vaccine) [3]

Several models of CLA vaccines have already been evaluated [3, 30]. What the first kind of vaccine evaluate for CLA prevention was killed whole bacteria (bacterin). However the protection level was only partial [47, 48]. The secreted toxoid of *C. pseudotuberculosis* (PLD) is another approach for CLA vaccine [49, 50]. Some studies have been used bacterin and toxoid combination [38, 51, 52]. A study vaccination against natural infection in goats using this kind of vaccine was not completely efficient and was recommended only as a protective measure against CLA [51]. The same strategy used in our study also were evaluated in others studies, but few antigens were assessed using this strategy, always with variable protection levels [20, 41, 53].

The Th1 response is considered to be the protective immunity against *C. pseudotuberculosis* infection [45, 54]. Moreover, the major cytokine involved in the effector mechanisms of this immune response is IFN- γ . This cytokine enhances phagocytosis activity in macrophages and activates CD8⁺ cytotoxic cells to destroy infected cells [53, 55]. IL-12 also has an important role in this process because it can be produced by antigen-presenting cells (APC) and drive Th0 cells to differentiate into Th1 effector cells. In our study, recombinant esterase rCP09720 was clearly able to induce a Th1 response, due to the significant IFN- γ production, high IgG2a levels and low biological levels of IL-10 and IL-4. However, this immune response was not able to confer a full protection against the virulent bacteria. This situation can point to some considerations. First, besides the antigen activates the adequate cellular immune response, the response intensity was not sufficient to quell the infection by an extreme virulent *C. pseudotuberculosis* strain. Second, since the antigen can activate a Th1 response, we could manipulate the immune response through different antigen doses, adjuvants, route of administration and time of vaccination to induce a more intense lymphocyte activation, cytokine and immunoglobulin production. In this way, our group is searching for new vaccinal methodologies to enhance the protection conferred by the recombinant esterase.

In conclusion, the recombinant esterase rCP09720 associated with Al(OH)₃ adjuvant protected 58.3% of the mice against *C. pseudotuberculosis* virulent challenge and induced a humoral response and adequate but not sufficient Th1 response required to fully protection. On the other hand, DNA vaccination with pTARGET/cp09720 showed 16.6% of protection in challenged mice induced IFN- γ production but failed to induce anti-rCP09720- specific antibodies.

Acknowledgements

This work had financial support from the Foundation for Research Support, of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), through project No. 11/1894-0.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

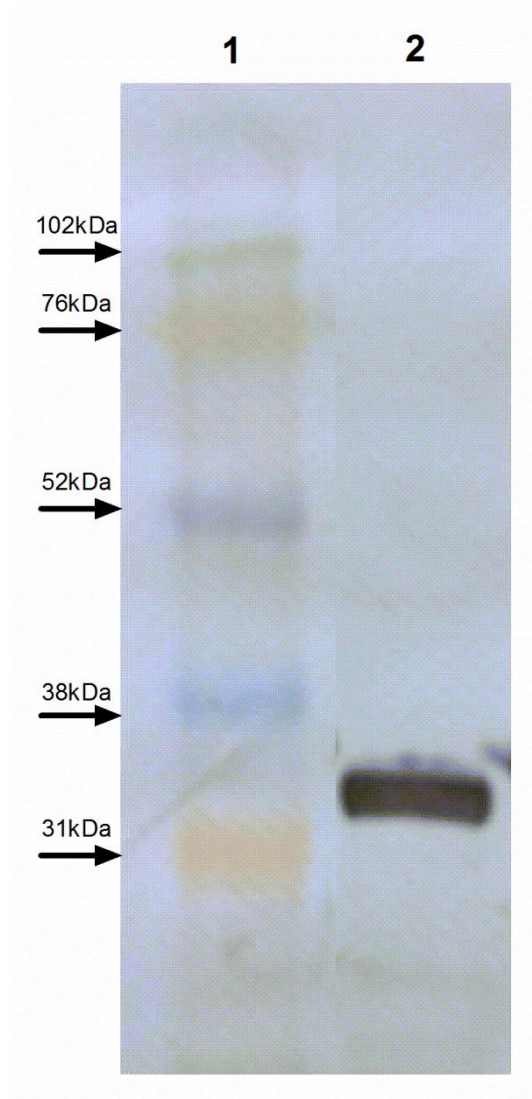


Figure 1: Western blot analysis using monoclonal (Mab) anti-6xHis antibody (1:4000) showing the purified rCP09720 with approximately 34 kDa, used for vaccine preparation. (1) rCP09720 protein. (2) Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare).

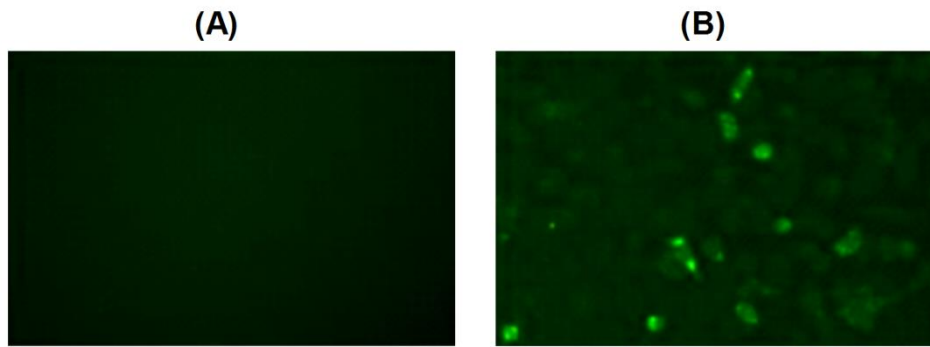


Figure 2: Indirect immunofluorescence of CHO cells transfected with (A) pTARGET control and (B) pTARGET/cp1957, using a polyclonal anti-rCP09720, revealed the in vitro expression of the CP09720 protein.

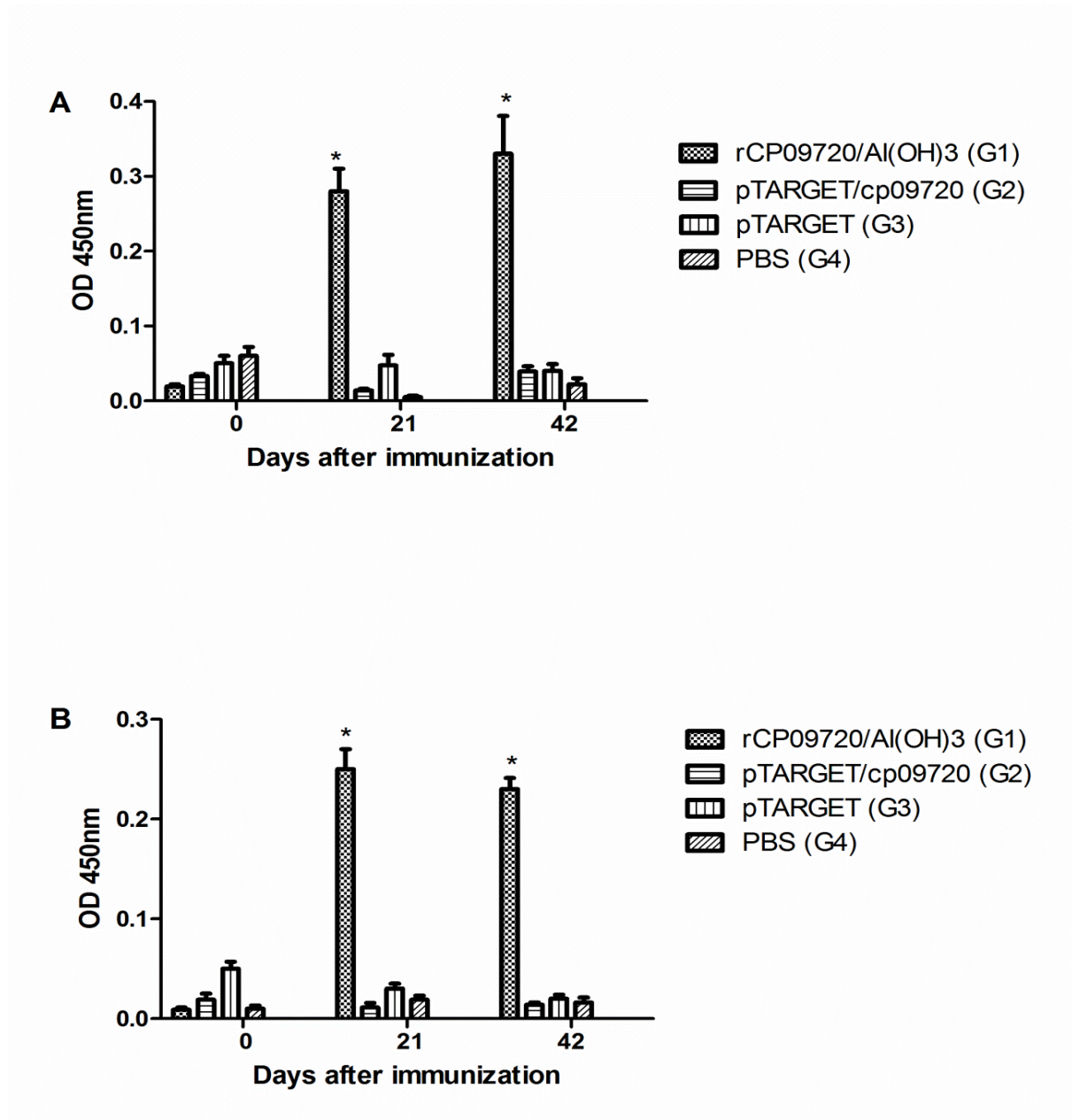


Figure 3: IgG1 (A) and IgG2a (B) levels induced by recombinant subunit and DNA vaccines developed with the target CP09720 of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The measurement was performed by Indirect ELISA at 0, 21 and 42 days post-immunization, and results were obtained in ELISA reader set at 450 nm and expressed as optical density values. Results are presented as means and standard deviation (bars) for each experiment with twelve animals per group. Significant differences between IgG isotypes production in different groups was calculated employing one-way ANOVA followed by the Tukey post-test. * Result statistically different ($p < 0.05$) in relation to negative control (G4). ** Result statistically different ($p > 0.05$) about all other groups.

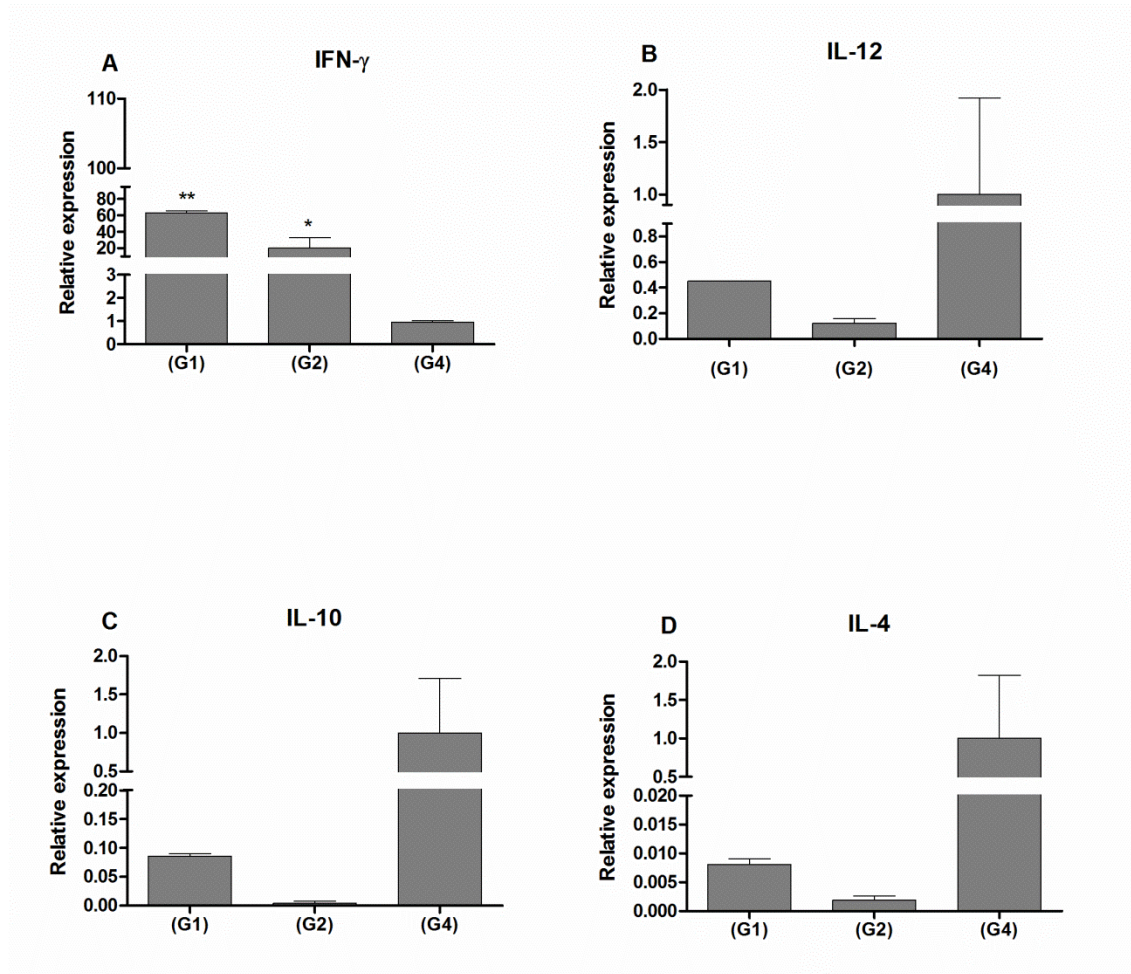


Figure 4: Relative expression of IFN- γ , IL-12, IL-10 and IL-4, induced in splenocyte cells taken from mice immunized with the vaccine formulations and their controls (at 21 days from the last immunization) quantified by real-time PCR. Results presented as a mean and standard error. **(G1)** rCP09720/Al(OH)₃, **(G2)** pTARGET/cp09720 and **(G4)** PBS vaccine groups. * Significantly higher results ($p < 0.05$) compared to the other experimental groups at the one-way ANOVA and Tukey post-test. ** Significantly higher results ($p < 0.05$) compared to controls and the other experimental groups at the one-way ANOVA and Tukey post-test.

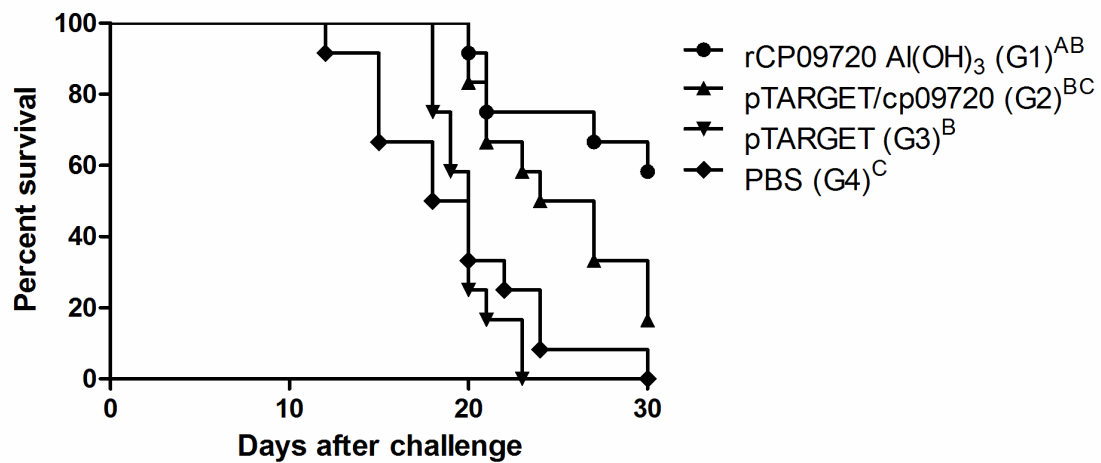


Figure 5: Survival curve of vaccinated animals using recombinant subunit and DNA vaccines after challenge with 10^4 CFU of an MIC-6 virulent strain of *C. pseudotuberculosis*. Animals were observed for 30 days. Survival curves with different letters are statically significant in Fisher's Exact Test ($p < 0.05$).

A tabela apresentada não faz parte do artigo apenas do documento da tese

Tabela 1. Grupos, doses e esquema vacinal usando o gene Cp09720 de *C. pseudotuberculosis*

Grupos vacinais (n=15)	Imunização			Desafio
	Dia 0	Dia 15	Dia 30	
A (rCp09720/(Al(OH)₃)	50µg	50µg	50µg	10 ⁴ Mic-6
B (pTARGET/09720)	50µg	50µg	50µg	10 ⁴ Mic-6
C (pTARGET)	50µg	50µg	50µg	10 ⁴ Mic-6
D (P B S)	50µL	50µL	50µL	10 ⁴ Mic-6

5. CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, foram desenvolvidas e testadas duas vacinas recombinantes para o controle de Linfadenite caseosa. A primeira esterase recombinante rCP09720 de *C. pseudotuberculosis* associada ao adjuvante hidróxido de Alumínio Al(OH)_3 protegeu 58,3% dos camundongos contra o desafio com cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* e induziu uma resposta humoral e resposta Th1 adequada, mas não suficiente para proteção total. Por outro lado, a vacina de DNA, pTARGET/cp09720 mostrou 16,6% de proteção.

A produção de IFN- γ foi induzida, no entanto, os títulos de anticorpos específicos anti-rCP09720 foram baixos e não suficientes para melhores índices de proteção.

6. REFERÊNCIAS

- Almeida, S., Dorneles, E.M.S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J, Carneiro, A., Bagano, P., Spier, S., Barh, D., Lage, A.P., Figueiredo, H., Azevedo, V. (2017) Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar Ovis and Equi. *BMC Vet Res.* Sep 25;13(1):290. doi: 10.1186/s12917-017-1210-5.
- Araújo C.L, Alvez J, Nogueira W, Pereira L.C, Gomide A.C, Ramos R, et al. (2019) Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene* (8):55.
- Barh D, Jain N, Tiwari S, Parida B.P, D'Afonseca V, Li L, et al. (2011) A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and other CMN group of human pathogens. *Chem Biol Drug Des*; 78:73–84. doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01118..
- Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, T.L. de P., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Meyer, R., Azevedo, V., (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J. Clin. Cell. Immunol.* 1, pp. 1–15. doi:10.4172/2155-9899.S4-005
- Baird, G.J. and Fontaine, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp Pathol.* 137, pp. 179-210.
- Braga, W.U. (2007) Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet Microbiol.* Jan 31;119 (2-4): pp. 297-303.
- Brogden, K.A; Cutlip, R.C; Lehmkuhl, H.D. (1985) Immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the effect of adjuvants in mice. *J Comp Pathol.* Apr 95(2): pp. 167-173.
- Brum, A.A., Rezende, A. de F.S., Brilhante, F.S., Collares, T., Begnine, K., Seixas, F.K., Collares, T. V., Dellagostin, O.A., Azevedo, V., Santos, A., Portela, R.W., Borsuk, S., (2017). Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microbiol.* 66, pp. 635–642.
- Cameron, C.M. and Bester, F.J. (1984) An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 51, pp. 263 - 267.
- Chaplin P.J, De Rose R, Boyle J.S, McWaters P, Kelly J, Tennent J.M, Lew A.M, Scheerlinck JP. (1999) Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun.* Dec;67(12) pp. 6434-8.

- Costa, M.P., McCulloch, J. a, Almeida, S.S., Dorella, F. a, Fonseca, C.T., Oliveira, D.M., Teixeira, M.F., Laskowska, E., Lipinska, B., Meyer, R., Portela, R.W., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V., (2011). 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 Res. Notes* 4, pp. 243. doi:10.1186/1756-0500-4-243 .
- D'Afonseca V, Moraes P.M, Dorella F.A, Pacheco L.G, Meyer R, Portela R.W, Miyoshi A, Azevedo V. (2008) A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet Mol Res.* Mar 18;7(1):pp. 252-60. Review.
- De Rose R, Tennent J, McWaters P, Chaplin PJ, Wood PR, Kimpton W, Cahill R, Scheerlinck JP. (2002) Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* Nov;90(1-2):pp. 55-63.
- D'Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Moraes, P.M., Pena, I., Ortega, J.M., Teixeira, S., Oliveira, S.C., Coser, E.M., Oliveira, L.M., Correa de, O.G., Meyer, R., Miyoshi, A. and Azevedo, V. (2010) Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiol. Res.* 165: pp. 312-320.
- de Sá Guimarães, A., do Carmo, F.B., Pauletti, R.B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A.P., Heinemann, M.B., Miyoshi, A., Azevedo, V., Guimarães Gouveia, A.M., (2011). Caseous lymphadenitis: *Epidemiology, diagnosis, and control*. IIOAB J. 2, pp. 33–43.
- Dorella F.A, Gala-Garcia A, Pinto A.C, Sarrouh B, Antunes C.A, Ribeiro D, et al. (2013) Progression of “OMICS” methodologies for understanding the pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the Brazilian experience. *Comput Struct Biotechnol J.*; 6.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V., (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37, pp. 201–18. doi:10.1051/
- Droppa-Almeida, D., Vivas, W.L.P., Silva, K.K.O., Rezende, A.F.S., Simionatto, S., Meyer, R., Lima-Verde, I.B., Delagostin, O., Borsuk, S., Padilha, F.F., (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine* 34, 1091–1096. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.064
- Droppa-Almeida D, Franceschi E, Padilha F.F. (2018) Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinform Biol Insights.* May 14;12: 1177932218755337.
- Eggleton, D. G., Middleton, H. D., Doidge, C.V. and Minty, D.W. (1991) Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Australian Veterinary Journal*, 68, pp. 317 - 319.

de Farias, A. E. M., Alves, J. R. A., Alves, F. S. F., Pinheiro, R. R., Faccioli-Martins, P. Y., Lima, A. M. C., de Azevedo, S. S., Alves, C. J. (2019) Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Epub. May*;51(4): pp. 745-752. doi: 10.1007/s11250-018-1748-7.

Ferrer, L. M. *et al.* (2009) 'Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in a Salz ewe', *Small Ruminant Research*, 87(1–3), pp. 126–127. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.10.011.`

Fontaine, M.C, Baird, G., Connor, K.M. *et al.* (2006) Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*. 24, pp. 5986–5996.

Gorman, J.K, Gabriel, M., MacLachlan, N.J., Nieto, N., Foley, J., Spier, S. (2010). Pilot immunization of mice infected with an equine strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Ther.* Spring;11(1): pp. 1-8.

Guimarães, A.S., Carmo, F.B., Heinemann, M.B., Portela, R.W., Meyer, R., Lage, A.P., Seyffert, N., Miyoshi, A., Azevedo, V. and Gouveia, A.M. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC. Vet. Res.* 7, pp. 68.

Guimarães, A.S., Carmo, F.B., Heinemann, M.B., Portela, R.W.D., Meyer, R., Lage, A.P., Seyffert, N., Miyoshi, A., Azevedo, V., Gouveia, A.M.G., (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Vet. Res.* 7, pp. 3–7. doi:10.1186/1746-6148-7-68

Hodgson A.L, Bird P, Nisbet I.T. (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* Mar;172(3):pp. 1256-61.

Leal, K.S., de Oliveira Silva, M.T., de Fátima Silva Rezende, A., Bezerra, F.S.B., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T., Dellagostin, O., Portela, R.W., de Carvalho Azevedo, V.A., Borsuk, S., (2018). Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine* 36, pp. 3578–3583. doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.049

Machado, P.R.L., Araújo, M.I.A.S., Carvalho, L. & Carvalho, E.M., (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 79(6): pp. 647-664.

Martin, A. (2005). Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 63: pp. 145–150.

Meyer, R.; Carminati, R.; Cerqueira, R. B.; Vale, V.; Viegas, S.; Martinez, T.; Nascimento, I.; Scaer, R.; Silva, J. A. H.; Ribeiro, M.; Régis, M.; Paule, B.; Freire, S. M. (2002). Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *R. Ci. Méd. Biol.*, v. 1, n. 1, pp. 42-48.

Moura-Costa, L.F, Bahia, R.C, Carminati, R., Vale, V.L.C, Paule, B.J, Portela, R.W., et al. (2008). 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*; 126: pp. 131–41. doi:10.1016/j.vetimm.2008.06.013.

Moussa, I.M, Ali, M.S, Hessain, A.M, Kabli, S,A, Hemeg, H.A, Selim, S,A. (2016) Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematousskin disease. *Saudi J Biol Sci*. Nov;23(6): pp.718-723.

Pacheco, L.G.C, Slade, S.E, Seyffert, N, Santos, A.R, Castro, T.L.P, Silva, W.M, et al. (2011) A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol.*; pp. 11:12.

Pacheco, L.G., Pena, R.R., Castro, T.L., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Carminati, R., Frota, M.N., Oliveira, S.C., Meyer, R., Alves, F.S., Miyoshi, A. and Azevedo, V. (2007) Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 56, pp. 480-486.

Paton, M.W.; Walker, S.B.; Rose, I.R. and Watt, G.F. (2003) Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of Caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 81: pp. 91–95.

Peel, M.M, Palmer, G.G, Stacpoole, A.M, Kerr, T.G. (1997) Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis*. Feb;24(2): pp. 185-91.

Piontkowski, M.D, Shivers, D.W. (1998) Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J Am Vet Med Assoc.* Jun 1;212(11): pp. 1765-8.

Raynal, J.T, Bastos, B.L, Vilas-Boas, P.C.B, Sousa, T.J, Costa-Silva, M., de Sá, M.D.C.A, Portela, R.W., Moura-Costa, L.F., Azevedo, V., Meyer, R. (2018) Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Res Notes*. Jan 25;11(1):73. doi: 10.1186/s13104-018-3180-5.

Rezende A de F, Brum, A.A, Reis, C.G, Angelo, H.R, Leal, K.S, Silva, M.T, Simionatto, S, Azevedo, V, Santos, A, Portela, R.W, Dellagostin, O., Borsuk, S. (2016) In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *J Med Microbiol.* Jun;65(6):521-9. doi: 10.1099/jmm.0.000263.

Ruiz, J.C, D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A.C., et al. (2011) Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *PLoS ONE* 6(4):pp. x.

Ribeiro, D., Rocha, F.D.E., Leite, K.M., Soares, S.D.E., Silva, A., Portela, R.W., Meyer, R., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Azevedo, V., Dorella, F.A., (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Acta Vet. Scand.* 45, 28. doi:10.1186/1297-9716-45-28

Santana-Jorge, K.T.O, Santos, T.M, Tartaglia, N.R, Aguiar, E.L, Souza, R.F.S, Mariutti, R.B, et al. (2016) Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*; 15:83. doi:10.1186/s12934-016-0479-6.

Santos, A.R., Carneiro, A., Gala-Garcia, A., Pinto, A., Barh, D., Barbosa, E., Aburjaile, F., Dorella, F., Rocha, F., Guimaraes, L., Zurita-Turk, M., Ramos, R., Almeida, S., Soares, S., Pereira, U., Abreu, V.C., Silva, A., Miyoshi, A. and Azevedo, V. (2012). The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. *BMC. Genomics* 13 Suppl 5, pp. 6.

Seixas, F.K, da Silva, E.F, Hartwig, D.D, Cerqueira, G.M, Amaral M, Fagundes, M.Q, Dossa, R.G, Dellagostin, O.A. (2007) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*. Dec 21;26(1):pp. 88-95.

Seyffert, N., Guimaraes, A.S., Pacheco, L.G., Portela, R.W., Bastos, B.L., Dorella, F.A., Heinemann, M.B., Lage, A.P., Gouveia, A.M., Meyer, R., Miyoshi, A. and Azevedo, V. (2010) High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Res. Vet. Sci.* 88, pp. 50-55.

Seyffert, N, Silva, R.F, Jardim, J., Silva, W.M, Castro, T.L, Tartaglia, N.R, Santana, K.T, Portela, R.W, Silva, A, Miyoshi, A, Le Loir, Y, Azevedo, V. (2014) Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Vet Microbiol.* Nov 7;174(1-2):pp. 255-60. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.024.

Shadnezhad, A, Naegeli, A, Collin, M. (2016) CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiol.* Nov 8;16(1):pp. 261.

Silva, M. T. de O. , Bezerra, F.S.B., de Pinho, R.B, Begnini, K. R., Seixas, F. K., Collares, T., Portela, R.D., Azevedo, V., Dellagostin, O., Borsuk, S. (2017) Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine* 36 (1). pp. 74-83.

Silva, J.W., Droppa-Almeida, D., Borsuk, S., Azevedo, V., Portela, R.W., Miyoshi, A., Rocha, F.S., Dorella, F. a, Vivas, W.L., Padilha, F.F., Hernández-Macedo, M.L., Lima-Verde, I.B., (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet. Res.* 10, 1–8. doi:10.1186/s12917-014-0304-6

Silva, A., Schneider, M.P., Cerdeira, L., Barbosa, M.S., Ramos, R.T., Carneiro, A.R., Santos, R., Lima, M., D'Afonseca, V., Almeida, S.S., Santos, A.R., Soares, S.C., Pinto, A.C., Ali, A., Dorella, F.A., Rocha, F., de Abreu, V.A., Trost, E., Tauch, A., Shpigel, N., Miyoshi, A. and Azevedo, V. (2011) Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *J. Bacteriol.* 193, pp. 323-324..

Simmons, C.P., Dunstan, S.J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, A.L. and Strugnell, R.A. (1998) Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66, pp. 474-479.

Souza, S. O. De *et al.* (2012) 'Linfadenite caseosa como causa de paralisia de membros pélvicos em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul', 40(July), pp. 2–5.

Solanet, J.J, Malena, R, Estein, S.M, Estevao, Belchior S., Paolicchi, F.A. (2011) Development of an ELISA test to detect antibodies in vaccinated sheep or infected *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev Argent Microbiol.* Jan-Mar;43(1): pp. 9-17. doi: 10.1590/S0325-75412011000100003.

Soares, S.C, Trost, E, Ramos, R.T, Carneiro, A.R, Santos, A.R, Pinto, A.C, Barbosa, E., Aburjaile, F., Ali, A, Diniz, C.A, Hassan, S.S, Fiaux, K, Guimarães, L.C, Bakhtiar, S.M, Pereira, U, Almeida, S.S, Abreu, V.A, Rocha, F.S, Dorella, F.A, Miyoshi, A, Silva, A, Azevedo, V, Tauch A. (2013) Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *J Biotechnol.* Aug 20;167(2):pp. 135-41. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.11.003

Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R., Paton, M.W., Middleton, H., (1987) a. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Aust. Vet. J.* 64 (9):pp. 263–266.

Sutherland, S.S., Paton, M.W., Mercy, A.R., Ellis, T.M., (1987) b. A reliable method for establishing caseous lymphadenitis infection in sheep. *Aust. Vet. J.* 64 (10):pp. 323–324.

Syame, S.M, Abuelnaga, A.S.M., Ibrahim, E.S, Hakim, A.S. (2018) Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for caseous lymphadenitis in sheep challenged. *Vet World.* Sep;11(9):pp. 1272-1276. doi: 10.14202/vetworld.2018.1272-1276.

Trost, E, Ott, L, Schneider, J, Schröder, J, Jaenicke, S, Goesmann, A, et al. (2010) The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12- year- old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*;11: pp. 728. doi:10.1186/1471- 2164-11-728.

Vale, V.L, Silva, M.da C, de Souza, A.P, Trindade, S.C, de Moura-Costa, L.F, Dos Santos-Lima, E.K, Nascimento, I.L, Cardoso, H.S, Marques, E de J, Paule, B.J, Nascimento, R.J. (2016) 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.* Sep 8;12(1):pp. 195. doi: 10.1186/

Windsor, P.A. (2011) Control of Caseous lymphadenitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 27, pp. 193-202.