

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**Tese de Doutorado**



***Análise do potencial vacinal de linhagens  
recombinantes e selvagens inativadas de  
*Corynebacterium pseudotuberculosis****

ORIENTADA: **Fernanda Alves Dorella**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Azevedo**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

BELO HORIZONTE

Março – 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Alves Dorella

Análise do potencial vacinal de linhagens  
recombinantes e selvagens inativadas de  
*Corynebacterium pseudotuberculosis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

Belo Horizonte

Março - 2009

*“A imaginação deveria dar asas aos nossos pensamentos,  
mas nós sempre precisamos de uma prova experimental decisiva,  
e, no momento de refletir, interpretar nossas observações e concluir,  
a imaginação deve ser verificada e documentada pelos resultados do experimento”.*

*Louis Pasteur*

## **Colaborações**

Este trabalho é fruto da colaboração entre os Laboratórios de Genética Celular e Molecular (LGCM - Prof. Dr. Vasco Azevedo e Prof. Dr. Anderson Miyoshi) e Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI - Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira), ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Dr. Roberto Meyer e Dr. Ricardo Wagner Dias Portela (Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia), Dr. Raphael Hirata Júnior (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro) e as empresas Vallée S.A., através de Maria do Carmo Cilento (Coordenadora de Projetos P&D - Vacinas) e Moacir Marchiori Filho (Consultor de Projetos P&D - Vacinas) e Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda., através de Vera Lúcia Fernandes (Setor de vacinas bacterianas).

## **Agradecimentos**

- *Agradeço a Deus por ter me dado força e perseverança nesta longa jornada!*
- *Ao meu orientador Vasco Azevedo, que durante esses oito anos de convívio sempre acreditou no meu potencial, mais do que eu mesma poderia acreditar. Obrigada novamente por acreditar no meu trabalho e pela confiança depositada em mim. Creio que desenvolvemos juntos um lindo trabalho!*
- *Ao meu co-orientador Anderson Miyoshi, pelo incentivo e pela força em todos esses anos. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pela grande ajuda!*
- *Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho de tese.*
- *À Pós-graduação em Genética, incluindo seus professores, alunos e funcionários. Foram seis anos de muito aprendizado!*
- *Ao professor Sérgio Costa Oliveira, pelo auxílio na área imunológica e principalmente aos alunos do LIDI Gilson Macedo, Fábio Vitarelli e Michele Barsante (in memoriam) pela grande ajuda nessa área.*
- *Ao professor Ricardo Portela pelo auxílio fundamental na correção deste trabalho.*
- *Ao “povo do LGCM”, Anderson Santos, Anne, Aracele, Camila, Clarissa, Daniel, Dayana, Fernanda Lima, Luis Pacheco, Luis Guimarães, Leonardo, Marcela, Marcília, Marina, Núbia, Pablo, Sarah, Síntia, Tessália, Thiago, Vívian, Wanderson (em ordem alfabética pra não ter conflito!!!) por terem me agüentado todo esse tempo, sei que tive meus surtos, mas vocês foram fundamentais para que eu prosseguisse. Vocês farão parte da minha vida sempre!*
- *À Kátia (Katita) pela enorme ajuda. Sem você eu não teria “SANGUE”, literalmente, para realizar este trabalho!*
- *À minha “filha biológica”, Paula, que participou de grande parte desta conquista. Muito obrigada mesmo!*
- *Ao meu “filho biológico”, Siomar, pela ajuda na bioinformática e pela amizade. Valeu demais!*
- *À minha “mãe biológica”, Dani, que me inseriu no mundo das vacinas, pela amizade de longa data!*
- *Aos amigos do GIDE, Selma, Flor, Seu Alberto e Zé Carlos, que sempre me acompanharam e me incentivaram!*
- *À Peú por ter cuidado dos meus “filhotes” camundongos!*

- Aos meus amigos que sempre me deram apoio e me entenderam quando eu não podia sair porque estava trabalhando!

- À minha família por ter sempre acreditado em mim. Tia Norinha, Tia Odete e Vovó Lourdes, o apoio de vocês foi fundamental nessa conquista!

- Às minhas queridas irmãs Bruna e Gabriela, desculpem-me pela chatice, por monopolizar o computador e reclamar do barulho. Vocês foram incríveis e são imprescindíveis na minha vida!

- E principalmente aos meus pais, Bruno e Verônica, que acreditaram na minha escolha de vida, nem sempre fácil de entender. Estou terminando uma fase muito importante na minha vida e essa conquista é também de vocês. Obrigada pelo apoio e pela confiança. Amo vocês!!!!

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	I
<b>Lista de tabelas</b> .....	II
<b>Lista de figuras</b> .....	III
<b>Resumo</b> .....	V
<b>Abstract</b> .....	VI
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	1
<b>1. Introdução geral</b> .....	2
<b>2. Delineamento da tese</b> .....	4
<b>SEÇÃO I</b> .....	6
<b>Capítulo I – <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary Research, 37: 201-218 (2006).</b>	7
<b>Capítulo II – Antigenes of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> and prospects for vaccine development. Expert Review of Vaccine, 8(2) :205-213 (2009).</b> .....	26
<b>SEÇÃO II</b> .....	36
<b>1. Qualificação do principal problema</b> .....	37
<b>2. Justificativa</b> .....	38
<b>2.1. Propostas para a solução do problema apresentado</b> .....	38
<b>Capítulo I – An improved protocol for electrotransformation of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>. Veterinary Microbiology, 114: 298–303 (2006).</b> .....	40
<b>Capítulo II – <i>In vivo</i> insertional mutagenesis in <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. Applied and Environmental Microbiology, 72: 7368–7372 (2006).</b> .....	47
<b>SEÇÃO III</b> .....	53
<b>1. Hipóteses do trabalho</b> .....	54
<b>2. Objetivos</b> .....	55
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	55
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	55
<b>SEÇÃO IV</b> .....	57
<b>Estratégia I - Desenvolvimento de uma vacina viva recombinante contra <i>C. pseudotuberculosis</i> em modelo murino</b> .....	58
<b>1. Material e Métodos</b> .....	58
<b>1.1. Linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> e condições de cultivo</b> .....	58
<b>1.2. Modelo animal</b> .....	58
<b>1.3. Ensaio de imunização</b> .....	58
<b>1.4. Desafio e determinação do nível de proteção</b> .....	60



1.5. Caracterização molecular das linhagens recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> selecionadas .....	60
1.6. Coletas de sangue.....	62
1.7. Detecção de imunoglobulinas a partir das amostras de soro dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	62
1.8. Cultura de células esplênicas para dosagem de citocinas .....	63
1.9. ELISA para detecção de citocinas .....	63
1.10. Ensaios de interação dos mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> selecionados com células murinas J774 .....	63
1.11. Análises estatísticas .....	65
2. Resultados .....	66
2.1. Imunização com as linhagens recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> e proteção contra o desafio com a linhagem virulenta de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	66
2.2. Caracterização molecular das linhagens CP09 e CP13 selecionadas.....	68
2.3. Ensaio final de imunização em camundongos utilizando as linhagens recombinantes selecionadas .....	77
2.4. Análise da produção de imunoglobulinas induzidas pela imunização com as linhagens recombinantes selecionadas .....	78
2.5. Caracterização do perfil de resposta imune celular induzido pela imunização dos camundongos com as linhagens recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	81
2.6. Ensaios de interação dos mutantes CP09 e CP13 com células J774 .....	85
3. Discussão.....	89
Estratégia II - Desenvolvimento de uma vacina inativada contra <i>C. pseudotuberculosis</i> em modelo murino.....	94
1. Material e Métodos.....	94
1.1. Linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> e condições de cultivo .....	94
1.2. Inativação das linhagens selvagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	94
1.3. Formulação das vacinas bacterianas inativadas .....	95
1.4. Modelo animal .....	95
1.5. Ensaios de imunização .....	95
1.6. Desafio e determinação do nível de proteção.....	96
1.8. Coletas de sangue.....	96
1.9. Detecção de imunoglobulinas a partir das amostras de soro dos animais imunizados .....	96
1.10. Cultura de células esplênicas para dosagem de citocinas .....	96
1.11. ELISA para detecção de citocinas .....	97
1.12. Análises estatísticas .....	97

<b>2. Resultados</b> .....	98
<b>2.1. Imunização de camundongos com as linhagens selvagens inativadas de <i>C. pseudotuberculosis</i> e proteção contra o desafio com a linhagem virulenta de <i>C. pseudotuberculosis</i></b> .....	98
<b>2.2. Ensaio final de imunização de camundongos com a linhagem selvagem inativada T1</b> .....	99
<b>2.3. Análise da produção de imunoglobulinas induzida pela imunização com as linhagens inativadas</b> .....	101
<b>2.4. Caracterização do perfil de resposta imune celular induzido pela imunização dos camundongos com as linhagens inativadas de <i>C. pseudotuberculosis</i></b> .....	104
<b>3. Discussão</b> .....	109
<b>SEÇÃO V</b> .....	111
<b>1. Conclusões</b> .....	112
<b>2. Perspectivas</b> .....	113
<b>SEÇÃO VI</b> .....	114
<b>1. Referências Bibliográficas</b> .....	115
<b>2. Anexos</b> .....	123

## Lista de abreviaturas

Ala	- Alanina
Asn	- Asparagina
BCIP	- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BHI	- Brain Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
D.O	- Densidade Ótica
ELISA	- Ensaio de absorção imunoenzimático
Gln	- Glutamina
Gly	- Glicina
HCl	- Ácido Clorídrico
IFN- $\gamma$	- Interferon-gama
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
Ile	- Isoleucina
kDa	- kilo Dalton
LC	- Linfadenite Caseosa
LD	- Dose letal
M	- Molar
Met	- Metionina
Min	- Minuto
ml	- Mililitro ( $10^{-3}$ L)
NaOH	- Hidróxido de Sódio
Nm	- Nanômetro
O.N.	- Overnight
OPD	- Orto-fenilenodiamina
PBS	- "Phosphate Buffer Solution"
PLD	- Fosfolipase D
pmole	- Picomole
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
rpm	- Rotações por minuto
Ser	- Serina
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral - alfa
Trp	- Triptofano
T20	- Tween 20
T80	- Tween 80
UFC	- Unidade Formadora de Colônias
Val	- Valina
$\mu$ g	- Micrograma ( $10^{-3}$ g)
$\mu$ l	- Microlitro ( $10^{-3}$ L)

## Lista de tabelas

<b>TABELA 1:</b> Descrição das linhagens recombinantes empregadas nos ensaios de imunização.....	59
<b>TABELA 2:</b> Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após 1 hora de interação.....	86
<b>TABELA 3:</b> Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após 3 horas de interação.....	87
<b>TABELA 4:</b> Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após 6 horas de interação.....	88
<b>TABELA 5:</b> Linhagens selvagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizadas neste trabalho.....	94

## Lista de figuras

<b>FIGURA 1:</b> Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes no primeiro ensaio de imunização.....	66
<b>FIGURA 2:</b> Representação gráfica dos índices de proteção conferidos aos animais imunizados com as linhagens recombinantes após o desafio com a linhagem selvagem.....	67
<b>FIGURA 3:</b> Seqüência nucleotídica do gene interrompido no mutante CP09.....	69
<b>FIGURA 4:</b> Análise de similaridade protéica obtida por Blastx.....	70
<b>FIGURA 5:</b> Resultado da análise de domínios conservados realizadas pelo programa InterProScan.....	71
<b>FIGURA 6:</b> Predição do peptídeo sinal da seqüência do mutante CP09 interrompida pelo transposon usando o programa SignalP 3.0.....	71
<b>FIGURA 7:</b> Predição de motivos transmembrânicos na seqüência do mutante CP09.....	72
<b>FIGURA 8:</b> Seqüência nucleotídica do gene interrompido no mutante CP13.....	73
<b>FIGURA 9:</b> Resultados das análises de similaridade nucleotídica e protéica obtida por Blastn e Blastx.....	74
<b>FIGURA 10:</b> Resultado da análise de domínios conservados realizadas pelo programa InterProScan.....	74
<b>FIGURA 11:</b> Predição do peptídeo sinal da seqüência do mutante CP13 interrompida pelo transposon usando o programa SignalP 3.0.....	75
<b>FIGURA 12:</b> Predição de motivos transmembrânicos na seqüência do mutante CP13.....	76
<b>FIGURA 13:</b> Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes selecionadas.....	78
<b>FIGURA 14:</b> Representação gráfica da produção de IgG específico pelos camundongos imunizados com as linhagens mutantes CP09 e CP13.....	79
<b>FIGURA 15:</b> Reprodução gráfica dos níveis de IgG1 produzidos após imunização com as linhagens mutantes.....	80
<b>FIGURA 16:</b> Representação gráfica dos níveis de IgG2a produzidos após imunização com as linhagens mutantes.....	81
<b>FIGURA 17:</b> Representação gráfica da produção de INF- $\gamma$ induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	82
<b>FIGURA 18:</b> Representação gráfica da produção de TNF- $\alpha$ induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	83
<b>FIGURA 19:</b> Representação gráfica da produção de IL-4 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	84
<b>FIGURA 20:</b> Representação gráfica da produção de IL-10 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	85

<b>FIGURA 21:</b> Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após uma hora de interação com as monocamadas de células J774.....	86
<b>FIGURA 22:</b> Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após três horas de interação com as monocamadas de células J774.....	87
<b>FIGURA 23:</b> Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após seis horas de interação com as monocamadas de células J774.....	88
<b>FIGURA 24:</b> Representação gráfica dos índices de proteção conferidos aos animais imunizados com as linhagens inativadas após o desafio com a linhagem selvagem.....	99
<b>FIGURA 25:</b> Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens inativadas selecionadas.....	101
<b>FIGURA 26:</b> Representação gráfica da produção de IgG específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox.....	102
<b>FIGURA 27:</b> Representação gráfica da produção de IgG1 específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox.....	103
<b>FIGURA 28:</b> Representação gráfica da produção de IgG2a específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox.....	104
<b>FIGURA 29:</b> Representação gráfica da produção de IFN- $\gamma$ induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	105
<b>FIGURA 30:</b> Representação gráfica da produção de TNF- $\alpha$ induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	106
<b>FIGURA 31:</b> Representação gráfica da produção de IL-4 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	107
<b>FIGURA 32:</b> Representação gráfica da produção de IL-10 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	108

## Resumo

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica mundialmente distribuída, que afeta ovinos e caprinos, e tem como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Apesar das perdas econômicas causadas pela LC, não há muita informação sobre os mecanismos moleculares da patogênese desta bactéria e a imunoprevenção contra a infecção não é capaz de reduzir a incidência da doença. Recentemente, nosso grupo de pesquisa obteve, através de mutagenese aleatória utilizando o TnFuZ, 34 linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* que apresentaram o fenótipo fosfatase alcalina positivo, dentre as quais foram identificados 21 loci diferentes. O objetivo do presente estudo foi empregar estes 21 mutantes previamente obtidos em ensaios de imunização visando a busca por novas alternativas vacinais contra a LC. Análises da produção de imunoglobulinas e citocinas foram realizadas para identificar o padrão da resposta imune após a imunização. Dentre as 21 linhagens testadas, a linhagem viva atenuada CP13 mostrou os melhores níveis de proteção, 75% em média, nos camundongos imunizados. E ainda, esta linhagem foi capaz de induzir níveis significativos de IgG e IgG2a, caracterizando uma resposta imune do tipo Th1, responsável pela eliminação de patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis*. Ensaios de interação com células murinas J774, *in vitro*, revelaram que CP13 apresentou viabilidade intracelular bastante diminuída. Isso pode ser devido à ausência da proteína codificada pelo gene interrompido pelo transposon, uma proteína secretada ligada ao sistema de transporte de ferro. Estes resultados mostraram o potencial vacinal deste mutante contra a LC. Em outra vertente, quatro linhagens selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis* foram também testadas em ensaios de imunização de camundongos BALB/c e sujeitas às mesmas análises imunológicas. A linhagem T1 inativada por formalina, consistindo de antígenos somáticos e secretados de *C. pseudotuberculosis*, mostrou os melhores níveis de proteção, acima de 70%, dos camundongos imunizados. E, ainda, induziu níveis significativos das imunoglobulinas mensuradas. Os resultados obtidos aqui destacam as linhagens CP13 e T1 inativada por formalina como potenciais vacinas, viva e inativada, respectivamente, contra LC selecionadas em modelo murino.

**Palavras-chave:** *C. pseudotuberculosis*, vacina, linfadenite caseosa, caprinos, ovinos

## Abstract

Caseous lymphadenitis (CLA) is a worldwide chronic disease that affects sheep and goat, whose etiological agent is *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Despite all economic losses caused by CLA, there is not much information about molecular mechanisms of the pathogenesis of this bacterium and the immune prophylaxis against the infection is not able to reduce the illness incidence. Recently, our research group obtained 34 positive alkaline phosphatase recombinant strains of *C. pseudotuberculosis*, through random mutagenesis using TnFuZ, of which we identified 21 different loci. The aim of the present study is employ these 21 previously obtained mutants in mice vaccination trials in order to search for new alternative vaccines against CLA. Analyses of immunoglobulins and cytokines were carried out to identify the immune response pattern after immunization. Among the 21 tested strains, a live attenuated CP13 strain showed the best protection level, 75% on average, in immunized mice. Moreover, this strain was able to elicit a significant level of IgG and IgG2a, characterizing a Th1 immune response, responsible for eliminating intracellular pathogens, such as *C. pseudotuberculosis*. Interaction assays with murine J774 cells, *in vitro*, revealed that CP13 had the intracellular viability diminished. This may be due to the lack of the protein codified for the transposon interrupted gene, an iron transport system binding secreted protein. These results showed the vaccine potential of this mutant against CLA. In another aspect, in this work, four inactivated wild strains of *C. pseudotuberculosis* were also tested in infection trials in BALB/c mice and subject to the same immunological analysis. A formalin-inactivated T1 strain, consisting of somatic and secreted antigens of *C. pseudotuberculosis*, showed the best protection level, above 70% on average, in immunized mice. And also induced significant levels of the immunoglobulins measured. The results obtained here pointed out CP13 and formalin-inactivated T1 strains as potential live and inactivated vaccines, respectively, against CLA selected in murine model.

**Key-words:** *C. pseudotuberculosis*, vaccine, caseous lymphadenitis, goat, sheep



# APRESENTAÇÃO

## 1. Introdução geral

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo que se destaca na pecuária mundial por ser o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos. A incidência da LC é relatada em diversos países, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil (Al-Rawashdeh & Al-Qudah, 2000; Connor *et al.*, 2000; Ben Said *et al.*, 2002; Binns *et al.*, 2002; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003).

A LC é uma doença infecto contagiosa crônica, que se caracteriza pela hipertrofia dos gânglios linfáticos localizados ao longo do corpo do animal, principalmente pequenos ruminantes. Esta doença é responsável por perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade, carne, leite, lã, pele, e eficiência reprodutiva dos animais infectados (Dorella *et al.*, 2006a e 2009). A transmissão da *C. pseudotuberculosis* entre caprinos e ovinos ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados bem como através de ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas quanto por fatores naturais como arbustos pontiagudos (Alves & Pinheiro, 1997). A forma mais freqüente da doença, a LC externa, é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos. Esses abscessos podem também se desenvolver em órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (Piontkowski & Shivvers, 1998). Em alguns casos, a infecção produz poucos sinais clínicos no animal, o que leva à impossibilidade de identificá-los até sua morte, tornando difícil a obtenção de dados sobre a prevalência dessa doença (Arsenault *et al.*, 2003).

Apesar de sua importância, não há diagnóstico subclínico, tratamento ou vacina que sejam realmente eficientes no combate à LC. O diagnóstico atualmente utilizado é baseado em cultura bacteriológica do material purulento, recolhido de animais com abscessos externos, e posterior identificação bioquímica e molecular. No entanto, este procedimento demanda tempo, é de alto custo e incapaz de identificar infecções subclínicas. Em relação ao tratamento da doença, o uso de antibióticos não é aconselhável visto que, além de bastante longo (dura de semanas a meses), não é totalmente eficaz, uma vez que os fármacos são incapazes de penetrar na cápsula dos abscessos. Inspeções periódicas do rebanho, isolamento dos animais doentes, tratamento e desinfecção de qualquer tipo de ferimento superficial, além da limpeza das instalações, são algumas das medidas profiláticas que podem ajudar a conter a doença (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006a e 2009).

Algumas vacinas estão disponíveis no mercado nacional e internacional, mas apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à sua utilização. Nem todas

as vacinas licenciadas para ovinos têm, por exemplo, a mesma eficiência para caprinos e, por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). A ineficácia do processo de imunização pode também estar associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. No Brasil, existem algumas vacinas disponíveis para uso, como a vacina viva atenuada produzida a partir da cepa 1002 da *C. pseudotuberculosis*, desenvolvida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A (EBDA) utilizada em caprinos; e a vacina Biodectin® (Fort Dodge), utilizada em ovinos, que contém toxóides purificados de *Clostridium septicum*, agente etiológico do edema maligno, *Cl. novyi* Tipo B (hepatite necrótica), *Cl. tetani* (tétano), *Cl. perfringens* tipo D (enterotoxemia) e culturas inativadas de *Cl. chauvoei* (carbúnculo sintomático), uma fração do *C. pseudotuberculosis* (LC) e um anti-helmíntico (moxidectina). Entretanto, todas essas vacinas ainda necessitam de uma avaliação quanto à sua real eficácia nos rebanhos caprinos e ovinos.

Considerando-se o atual *status* da LC no Brasil é imperativo o desenvolvimento de alternativas mais eficientes que visem, não somente tratar o animal, mas também minimizar ou até mesmo evitar o surgimento da doença nos rebanhos. Um dos principais esforços que têm sido realizados visando erradicar a doença se refere à identificação de fatores de virulência e genes que estejam relacionados à patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*. Estes, além de ajudar a melhor entender a biologia do microrganismo, visam também contribuir no desenvolvimento de vacinas mais eficientes, bem como diagnósticos da doença na fase subclínica, para auxiliar no tratamento e controle da LC.

## 2. Delineamento da tese

O presente manuscrito de tese encontra-se subdividido em seções de acordo com os assuntos a serem abordados, como se segue:

- a. Em sua primeira seção encontra-se uma revisão da literatura sobre a bactéria *C. pseudotuberculosis* apresentada em dois capítulos, em forma de artigos de revisão, que fazem uma ampla abordagem do patógeno *C. pseudotuberculosis* bem como da enfermidade por ele causada.
  - i. O primeiro capítulo visa situar o leitor acerca das características mais relevantes de *C. pseudotuberculosis*, tais como: características microbiológicas, bioquímicas, taxonômicas, aspectos gerais da infecção, LC, fatores de virulência, além de um apanhado geral sobre as estratégias moleculares já utilizadas para o estudo destes fatores nesta bactéria.
  - ii. O segundo capítulo visa apresentar ao leitor uma abordagem mais profunda da LC (enfermidade causada pela *C. pseudotuberculosis*), sua patogenia e imunologia, tratamentos e vacinas disponíveis e sua eficácia, além da busca por alternativas vacinais no combate à doença.
- b. Na segunda seção estão descritos o principal problema a ser abordado e a justificativa, onde apresentamos propostas para a solução deste problema. Nesta seção também estão presentes dois capítulos, em forma de artigos científicos, que constituem uma das propostas sugeridas:
  - i. O primeiro capítulo apresenta um artigo científico referente ao desenvolvimento de um protocolo de transformação mais eficiente de *C. pseudotuberculosis* facilitando assim a manipulação genética da bactéria, indispensável ao presente trabalho de tese.
  - ii. Um segundo capítulo, também sob a forma de artigo científico, no qual é relatado o processo de obtenção de mutantes de *C. pseudotuberculosis* através de mutagênese aleatória o utilizando o transposon TnFuZ;
- c. Em uma terceira seção trazemos as hipóteses que nos levaram à realização deste trabalho de tese, e os objetivos a serem alcançados para prová-las.

- d. A quarta seção é composta pela metodologia empregada, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. Todos esses dados estão divididos em duas estratégias, como proposto:
- i. A primeira estratégia se refere ao desenvolvimento de uma vacina viva recombinante no combate à LC, em modelo murino. Estão descritos os ensaios de imunização, análise de proteção e demais análises realizadas com as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*;
  - ii. A segunda estratégia trata do desenvolvimento de uma vacina inativada contra a LC, também em modelo murino. Neste estão descritos os ensaios de imunização, análise de proteção e análises imunológicas realizadas com as linhagens selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis*;
- b. Em sua quinta seção estão contidas as conclusões e perspectivas deste trabalho de tese;
- c. E, finalmente, em sua sexta seção encontram-se as referências bibliográficas utilizadas neste manuscrito e os anexos onde estão contidas as produções científicas da aluna durante o Doutorado.

# SEÇÃO I

**Capítulo I** – *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37: 201-218 (2006).

No início de nossos trabalhos com *C. pseudotuberculosis*, em 2003, percebemos a escassez de informações sobre esta bactéria na literatura científica, principalmente porque os trabalhos existentes, até então, quase não contemplavam os artigos de revisão. Até o ano de 2003, das 313 publicações constantes na base de dados PUBMED (busca pelo termo "*Corynebacterium pseudotuberculosis*"; <http://www.pubmed.gov>) somente oito apresentavam-se na forma de revisão (Cameron, 1972; Lipsky *et al.*, 1982; Bartolomé *et al.*, 1995; Stehman, 1996; Peel *et al.*, 1997; Songer, 1997; Williamson, 2001; Selim, 2001) das quais, somente um trabalho (Williamson, 2001) mencionava exclusivamente nossa área de estudo.

Sabendo da importância das revisões para o desenvolvimento e a realização de trabalhos científicos, e ainda, visando suprir nossa própria necessidade de uma revisão mais aprofundada sobre o assunto, entre os anos de 2004 e 2005, decidimos realizar um extenso trabalho de síntese sobre as principais características de *C. pseudotuberculosis* contemplando diversas áreas. Este trabalho abordou a microbiologia, bioquímica e taxonomia da bactéria, os aspectos gerais da infecção, a LC e os principais determinantes de virulência desta bactéria. Citamos também as atuais estratégias moleculares empregadas no estudo da virulência de *C. pseudotuberculosis*, incluindo as últimas pesquisas na identificação de novos genes e fatores de virulência.

O presente trabalho de revisão foi publicado ao final do primeiro ano de Doutorado e está apresentado na seqüência deste manuscrito.

Review article

***Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence**

Fernanda Alves DORELLA<sup>a</sup>, Luis Gustavo Carvalho PACHECO<sup>a</sup>, Sergio Costa OLIVEIRA<sup>b</sup>, Anderson MIYOSHI<sup>a</sup>, Vasco AZEVEDO<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

(Received 2 February 2005; accepted 4 November 2005)

**Abstract** – *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA), a common disease in small ruminant populations throughout the world. Once established, this disease is difficult to eradicate because drug therapy is not effective and because the clinical detection of infected animals is of limited efficiency. We reviewed the microbiological, biochemical and taxonomic features of *C. pseudotuberculosis*, general aspects of infection, the main virulence determinants and currently available commercial vaccines. We also examined the current molecular strategies for the study of virulence in *C. pseudotuberculosis*, including the latest research on the identification of novel virulence factors and genes, which will help us to better understand the biology of this microorganism. This knowledge may also contribute to the development of improved CLA vaccines, including subunit and DNA-based types, as well as to improve the diagnosis, treatment and control of this disease.

***Corynebacterium pseudotuberculosis* / caseous lymphadenitis / pathogenesis / virulence / vaccine**

Table of contents

1. Introduction .....	202
2. Microbiological, biochemical and taxonomic features of <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	202
2.1. Microbiological aspects .....	202
2.2. Biochemical properties.....	203
2.3. Antimicrobial susceptibility .....	203
2.4. Taxonomy .....	206
3. General aspects of <i>C. pseudotuberculosis</i> infection .....	207
3.1. Transmission .....	207
3.2. Human cases.....	207
3.3. Caseous lymphadenitis .....	207

\* Corresponding author: vasco@icb.ufmg.br



3.4. Epidemiology of CLA .....	208
3.5. Diagnosis and control of CLA .....	208
4. From proteins to DNA: Commercial and experimental vaccines .....	208
4.1. Commercial vaccines .....	208
4.2. Experimental vaccines .....	210
5. Determinants of virulence .....	210
5.1. Phospholipase D .....	210
5.2. Toxic cell-wall lipids .....	211
5.3. New candidates .....	211
6. Molecular strategies for the study of virulence in <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	211
6.1. Identification of immunodominant peptides .....	211
6.2. Generation of mutants .....	212
7. Future directions .....	212

## 1. INTRODUCTION

The genus *Corynebacterium* belongs to a suprageneric group of actinomycetes that also includes the genera *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* [46, 87, 100, 102]. These gram-positive bacteria (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species), termed the CMN group, constitute a very heterogeneous group; however, most of the species share particular characteristics, such as: (i) a specific cell wall organization, mainly characterized by the presence of a huge polymer complex composed of peptidoglycan, arabinogalactan and mycolic acids [5, 26–28, 39, 45, 48] and (ii) high G+C content (47–74%) [39, 40, 43, 80]. The genomes of several species of this group have already been completely sequenced; this fact reflects the considerable medical, veterinary and biotechnological importance of these organisms (Tab. I).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is an important animal pathogen. It is the etiological agent of a disease that is commonly called caseous lymphadenitis (CLA) or cheesy gland [114]. This disease is found in all the world's major sheep and goat production areas, causing significant economic losses [85, 114].

In this review, we present the main microbiological characteristics of *C. pseudotuberculosis*. Bacterial virulence determinants, including previously reported vir-

ulence factors and recently identified molecules, are discussed, with emphasis on the molecular strategies that have been used to identify and study such determinants. The aspects regarding CLA are also covered, focusing on the currently-available commercial and experimental vaccines.

## 2. MICROBIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND TAXONOMIC FEATURES OF *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

### 2.1. Microbiological aspects

*C. pseudotuberculosis* was isolated from bovine farcy in 1888 by Nocard. Preisz, in 1894, was the first to completely describe this microorganism and to observe its resemblance to the diphtheria bacillus. Synonyms for *C. pseudotuberculosis* were *Bacillus pseudotuberculosis ovis*, *Bacillus pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ovis* and Preisz-Nocard bacillus [59, 72].

This microorganism is a facultative intracellular pathogen that exhibits pleomorphic forms, such as coccoids and filamentous rods, ranging in size from 0.5  $\mu\text{m}$  to 0.6  $\mu\text{m}$  by 1.0  $\mu\text{m}$  to 3.0  $\mu\text{m}$  [17, 28, 72, 97]. It is a non-sporulating, non-capsulated and non-motile bacterium; however, it has fimbriae [17, 46, 72]. This bacterium is a facultative anaerobe and grows best at

37 °C, at a pH of 7.0 to 7.2 [17, 72, 97]. It grows sparse initially on the agar surface and then becomes organized in clumps or in palisades, taking on a cream to orange coloration; colonies are dry, opaque and concentrically ringed. Growth in fluid medium develops as a granular deposit with a surface pellicle [17, 72, 77]. Haemolysis on blood agar is variable, but large zones develop in the presence of *Rhodococcus equi* [17]. *C. pseudotuberculosis* toxin inhibits the action of staphylococcal  $\beta$ -lysin [59].

*C. pseudotuberculosis* stains Gram-positive and when stained by Albert's or Neisser's method, volutin granules can be visualized. These metachromatic granules are clearly observed in the bacillary form, but are absent from coccoid cells; they contain high-energy phosphate reserves [46, 72].

## 2.2. Biochemical properties

Cell wall peptidoglycan is based on *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-DAP). Arabinose and galactose are major cell wall sugars. Short-chain mycolic acids (corynomycolic acids, 22–36 carbon atoms) are present [59, 94, 97]. Biochemical reactions of *C. pseudotuberculosis* isolates vary considerably, mainly in their fermenting ability [72, 100, 105]. All strains produce acid, but not gas, from many carbon sources, including glucose, fructose, maltose, mannose, and sucrose [17, 53, 59, 72]. This bacterium is phospholipase D and catalase positive, oxidase negative, and it is beta-hemolytic [59, 77, 100]. Strains isolated from small ruminants generally do not reduce nitrate [17, 72, 100, 114].

A well-established biochemical test for coryneform bacteria identification is the API Coryne system (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France). This method consists of 21 biochemical tests; it can be performed in 24–48 h. The test contains 20 tubes containing substrates that allow for 11 enzyme tests (pyrazinamidase,

pyrrolidonyl arylamidase,  $\beta$ -galactosidase, alkaline phosphatase,  $\alpha$ -glucosidase, *N*-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -glucuronidase, and nitrate reduction and gelatin, urea and esculin hydrolysis) and eight carbohydrate fermentation tests (glucose, ribose, D-xylose, mannitol, maltose, lactose, sucrose and glycogen). This system is more reliable and rapid when it is compared with standard identification methods (API-bioMérieux, Inc.). A summary of general biochemical properties of *C. pseudotuberculosis* is presented in Table II.

## 2.3. Antimicrobial susceptibility

The susceptibility pattern of *C. pseudotuberculosis* to antimicrobial agents varies among isolates obtained from various sources [28, 37, 66]. Muckle and Gyles [77], in a study of 26 strains isolated from lesions of caseous lymphadenitis in goats, reported that all strains were susceptible to the antibiotics ampicillin, chloramphenicol, lincomycin, gentamicin, tetracycline, penicillin G and sulfamethoxazole-trimethoprim. Only three isolates were susceptible to neomycin, and all strains were resistant to streptomycin. Garg et al. [40] reported strains of *C. pseudotuberculosis* that were strongly resistant to penicillin but susceptible to neomycin. A strain highly resistant to streptomycin (500  $\mu$ g/mL) was observed in a study of 22 isolates of *C. pseudotuberculosis* from sheep and goat abscesses [90]. Minimal inhibitory concentration (MIC) values for all isolates were similar for the various antimicrobial agents. Later studies also indicated a similarity of MIC values among strains [1, 29, 60]. However, Fernández et al. [35] found higher MIC values for several antimicrobial agents, in an analysis of corynebacteria isolated from ewe mastitis.

Olson et al. [82] grew *C. pseudotuberculosis* as a biofilm, in an attempt to reproduce the environment of a natural infection. They observed that this bacterium was highly resistant to all the drugs that they tested under such growth conditions.

**Table 1.** The main representatives of the CMN group.

Representative	Status	Importance	Sequenced strain	Genome size (Mbp)	GC contents (%)	Reference
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Complete	Causal agent of the disease diphtheria in humans	NCTC 13129	2.488	53	[20]
<i>Corynebacterium efficiens</i>	Complete	Production of glutamate and other amino acids and compounds	YS-314	3.147	63	[81]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Complete	Production of glutamate, other amino acids (L-lysine) and compounds	ATCC 13032	3.309	53	[55]
<i>Mycobacterium avium</i>	In progress	Causes tuberculosis in birds and disseminated infections in immunocompromized humans (the elderly, children, and especially patients with AIDS)	104	5.480	68	<a href="http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html">http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html</a>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Complete	Causative agent of Johne's disease, or paratuberculosis, a chronic severe intestinal infection. The disease affects domestic and free-ranging ruminants, but has also been reported in primates, rabbits, stoats and foxes	k10	4.829	69	[88]
<i>Mycobacterium bovis</i>	Complete	Causative agent of classic bovine tuberculosis, but it can also cause the disease in humans, especially if contaminated milk is consumed without prior pasteurization. This is a fully virulent strain	AF2122/97	4.345	65	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/</a> [41]
<i>Mycobacterium bovis</i>	In progress	Causative agent of classic bovine tuberculosis, but it can also cause the disease in humans. This is the strain that is used to produce BCG (Bacille de Calmette et Guérin) vaccine, a well-known tuberculosis vaccine	BCG	4.400	57	<a href="http://www.pasteur.fr/recherche/umites/L-gmb/mycogenomics.htm">http://www.pasteur.fr/recherche/umites/L-gmb/mycogenomics.htm</a>
<i>Mycobacterium leprae</i>	Complete	Causative agent of human leprosy	TN	3.268	57	[38]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	In progress	Generally non-pathogenic mycobacterium capable of causing soft tissue lesions. This bacterium was initially isolated from human smegma. It is associated with soft tissue lesions following trauma or surgery	MC2 155	7.040	57	<a href="http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html">http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html</a>

Table I. Continued.

Representative	Status	Importance	Sequenced strain	Genome size (Mbp)	GC contents (%)	Reference
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Complete	Causative agent of tuberculosis. It is highly contagious, infecting approximately 80% of the patient's social contacts	CDC1551	4.403	65	[36]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Complete	Causative agent of tuberculosis. Unlike some clinical isolates, it retains full virulence in animal models of tuberculosis and is susceptible to drugs and receptive to genetic manipulation	H37Rv	4.411	65	[25]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	In progress	Causative agent of tuberculosis. It was subsequently found that this strain is one of the most wide-spread and virulent <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains	210	4.400	57	<a href="http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html">http://www.tigr.org/db/mdb/mdbinprogress.html</a>
<i>Nocardia farcinica</i>	Complete	The causative agent of nocardiosis, affecting the lung, central nervous system, and cutaneous tissues of humans and animals This species exhibits a greater degree of virulence than the more common <i>Nocardia asteroides</i>	IFM 10152	6.021 (Chromosome) 0.184 (Plasmid pNF1) 0.087 (Plasmid pNF2) 9.700	70 67 68	[56]
<i>Rhodococcus</i> sp.	In progress	Microbe capable of degrading a wide variety of polychlorinated biphenyls	RHA1			<a href="http://www.rhodococcus.ca">http://www.rhodococcus.ca</a>

**Table II.** Biochemical characteristics of *C. pseudotuberculosis*.

Biochemical characteristics			
Acid production		Hydrolysis	
Glucose	+	Esculin	–
Arabinose	d	Hippurate	–
Xylose	–	Urea	+
Rhamnose	–	Tyrosine	–
Fructose	+	Casein	–
Galactose	+		
Mannose	+	Phosphatase	+
Lactose	–	Pyrazinamidase	–
Maltose	+	Methyl red	+
Sucrose	d	Nitrate reduction	d
Trehalose	–	Catalase	+
Raffinose	–	Oxidase	–
Salicin	–	Lipophilism	–
Dextrin	d		
Starch	–		

+: more than 90% are positive; d: 21–89% are positive; –: more than 90% are negative or resistant.

## 2.4. Taxonomy

Classification of *C. pseudotuberculosis* was originally based on morphological and biochemical characteristics [59, 77]. Nitrate reductase production was used by Biberstein et al. [8] to distinguish the *equi* biovar (isolated from horses and cattle; nitrate reduction positive) from the *ovis* biovar (isolated from sheep and goats; nitrate reduction negative). Later, Songer et al. [100] reached the same conclusion using restriction endonuclease (*EcoRV* and *PstI*) analyses of chromosomal DNA, and based on nitrate reduction data. More recently, the same result was also observed with restriction fragment length polymorphisms of 16S-rDNA [29, 105, 111]. Connor et al. [28] used pulsed-field gel electrophoresis, associated with biochemical analysis, for the characterization of *C. pseudotuberculosis* isolates.

A close relationship between *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* was suggested by the fact that these organisms are unique among the corynebacteria in producing phospholipase D [15, 44]. Moreover, some strains of *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* can produce diphtheria toxin (DT). Furthermore, some non-toxigenic strains are converted to toxigeny (DT production) by  $\beta$ -phages from toxinogenic *C. diphtheriae* [15, 23, 24, 44].

Molecular methods, including nucleic acid hybridization and 16S rRNA gene sequence analysis, have been used to determine the degree of relatedness of many different corynebacterial species and strains [54, 62, 95, 107]. Riegel et al. [95] found that some strains of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* belong to a monophyletic group, based on phylogenetic analysis of small-subunit rDNA sequences that are only found in the CMN group. They also

concluded that the *equi* and *ovis* biovars of *C. pseudotuberculosis* should not be classified as subspecies, due to their high genomic similarity. In two other independent studies [54, 107], *C. pseudotuberculosis* was found to be closely related to *C. ulcerans*.

More recently, analysis of partial gene sequences from the  $\beta$ -subunit of RNA polymerase (*rpoB*) has been shown to be more accurate for the identification of *Corynebacterium* species than analyses based on 16S rDNA [61, 62]. This method has also been successfully used to identify mycobacterial species [63]. Although the *rpoB* gene is a powerful identification tool, many authors propose that it may be used to complement the 16S rRNA gene analysis in the phylogenetic studies of *Corynebacterium* and *Mycobacterium* species [61–63, 74]. We have constructed a phylogenetic tree based on *rpoB* gene sequences of reference strains from the CMN group (Fig. 1). Based on this phylogenetic tree, we can observe a clear relationship between *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans*. Moreover, analysis using the *rpoB* gene allowed the identification of the group that these two species belong to, as previously observed [61, 62].

### 3. GENERAL ASPECTS OF *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* INFECTION

Though *C. pseudotuberculosis* was originally identified as the causative microorganism of CLA in sheep and goats, this bacterium has also been isolated from other species, including horses, in which it causes ulcerative lymphangitis and pigeon fever in cattle, camels, swine, buffaloes, and humans [89, 97, 114, 117].

#### 3.1. Transmission

The potential of *C. pseudotuberculosis* to survive for several weeks in the environment likely contributes to its ability to spread within a herd or flock [4, 117].

Transmission among sheep or goats occurs mainly through contamination of superficial wounds, which can appear during common procedures, such as shearing, castration and ear tagging, or through injuries of the animal's bodies generated by other traumatic events. Not infrequently, contaminated sheep cough bacteria onto skin cuts of other sheep, constituting another means of transmission [84, 114]. In cattle, as well as in buffaloes, there is evidence of mechanical transmission of this bacterium by houseflies and by other Diptera, though the natural mechanisms of infection with *C. pseudotuberculosis* are not well documented [97, 116, 117].

#### 3.2. Human cases

Human infection caused by *C. pseudotuberculosis* is a rare event, and most of the reported cases have been related to occupational exposure; one case, diagnosed in 1988, involved the ingestion of raw goat meat and cow milk [89]. About 25 cases of infection of humans with this microorganism have been reported in the literature [67, 73, 89].

Peel et al. [89] reviewed 22 cases, in which infected humans were generally presented with lymphadenitis, abscesses, and constitutional symptoms. Mills et al. [73] described suppurative granulomatous lymphadenitis in a boy, due to contact with contaminated farm animals. Liu et al. [67] reported a *C. pseudotuberculosis* infection in a patient's eye, due to an ocular implant.

In most cases, the patients received antibiotic therapy and the affected lymph nodes were surgically removed [67, 73, 89].

#### 3.3. Caseous lymphadenitis

Caseous lymphadenitis causes significant economic losses to sheep and goat producers worldwide, mainly due to the reduction of wool, meat and milk yields, decreased reproductive efficiencies of affected animals and condemnation of carcasses and skins in

abattoirs [3, 83]. The manifestations of CLA in small ruminants are characterized mainly by bacteria-induced caseation necrosis of the lymph glands. The most frequent form of the disease, external CLA, is characterized by abscess formation in superficial lymph nodes and in subcutaneous tissues. These abscesses can also develop internally in organs, such as the lungs, kidneys, liver and spleen, characterizing visceral CLA [72, 91]. In some cases, the infection produces few obvious clinical signs in the animal, remaining unrecognized until a post-mortem examination has been carried out, making it difficult to obtain definitive data about the prevalence of this disease [3, 17, 83].

### 3.4. Epidemiology of CLA

Recent epidemiological surveys have examined the prevalence of CLA in different countries [2, 3, 6, 11, 28, 85]. Among flocks surveyed in Australia, the average prevalence of CLA in adult sheep was 26% [85]. Forty-five percent of the farmers interviewed in a study in the United Kingdom had seen abscesses in their sheep; however, this could be an overestimation of CLA prevalence since few farmers had investigated the causes of the abscesses [11]. Twenty-one percent of 485 culled sheep examined in Canadian slaughterhouses had CLA [3]. This disease remains an important subject of veterinary concern throughout the world.

### 3.5. Diagnosis and control of CLA

Controlling CLA with antibiotics is not an easy task, since viable bacteria stay protected inside abscesses due to the thick capsule that surrounds them [91, 103, 114]. It is generally agreed that the best strategy to control the disease is vaccination of healthy animals, along with the identification/removal of infected animals [13, 71, 84, 114]. However, the difficulties associated with the early clinical identification of infected animals can be a hindrance to such a strategy.

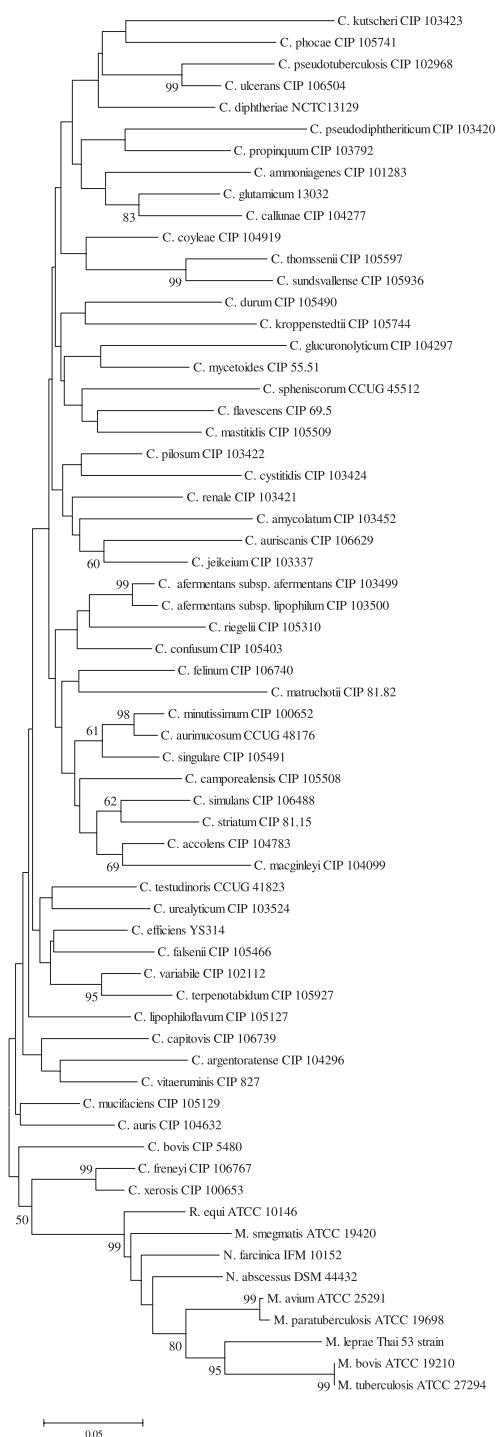
Several serodiagnostic tests have been developed to overcome the problem of clinical identification of CLA, but most have been reported to lack either sensitivity or specificity [14, 16, 70, 71, 104, 114, 118]. Nevertheless, some enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based diagnostic tests have been reported to be effective in control and eradication programs [32, 33, 110]. Recently, ELISA tests to detect gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), as a marker of cell-mediated immunity against *C. pseudotuberculosis*, have been developed [71, 86, 93]. The IFN- $\gamma$  ELISA test appears to be more sensitive than the normal antibody ELISA in detecting prior infection in goats, and it does not seem to be affected by vaccination in sheep [71]. Another novel strategy that holds promise for the diagnosis of CLA is the use of polymerase chain reaction (PCR) tests specific for *C. pseudotuberculosis* to identify bacteria isolated from abscesses [21].

## 4. FROM PROTEINS TO DNA: COMMERCIAL AND EXPERIMENTAL VACCINES

### 4.1. Commercial vaccines

Most of the currently-available commercial vaccines for caseous lymphadenitis are combined with vaccines against other pathogens. These include *Clostridium tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi* and *Cl. chauvoei* [85, 91, 103, 114]. These vaccines are based on inactivated phospholipase D (PLD) and are called toxoid vaccines.

Paton et al. [84], in an analysis of the effectiveness of a combined toxoid vaccine against CLA, reported a reduction in the number and size of CLA lung abscesses and a decrease in the spread of this disease within the flock. However, in another study [85], it was reported that although 43% of the farmers applied commercial CLA vaccines, only 12% used them correctly. It was concluded that adjustments in vaccination



**Figure 1.** Dendrogram representing the phylogenetic relationships of the CMN group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species) obtained by the neighbor-joining method [96]. The tree was derived from the alignments of *rpoB* gene sequences. The phylogenetic distances were calculated by the software MEGA 3 [64]. The support of each branch, as determined from 1 000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (in percent).



programs would dramatically diminish the prevalence of CLA.

Not all the vaccines licensed for use in sheep can be used to vaccinate goats. Moreover, while the recommended vaccination program for sheep consists of two priming doses in lambs and yearly boosters in adult sheep, revaccination is recommended at six-month intervals in goats [85, 114].

A live attenuated vaccine strain of *C. pseudotuberculosis*, strain 1002, has been licensed for use in Brazil since 2000. It is already being produced industrially and is available in a liquid form that must be administered yearly to the animals, subcutaneously; a lyophilized version is also being developed by the Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (<http://www.ebda.ba.gov.br>). This live vaccine was reported to confer around 83% protection against CLA in goats in experimental assays and in field trials.

## 4.2. Experimental vaccines

*C. pseudotuberculosis* Toxminus (pld mutant) has been used as a live bacterial vector to deliver heterologous antigenic proteins [75]. Five heterologous genes (the gene coding for *Mycobacterium leprae* 18-kDa antigen, *Taenia ovis* 45W gene, *Babesia bovis* 11C5 antigen, the *Dichelobacter nodosus* gene encoding mature basic protease (*bprV*) and *Anaplasma marginale* ApH antigen), plus a genetically inactivated analogue of PLD, were used to construct plasmids expressing foreign genes in the Toxminus strain. Three proteins elicited specific antibody responses in experimentally vaccinated sheep. The expression by Toxminus of mature basic protease (*bprV*) of *D. nodosus* fused to the carboxy-terminus of *Mycobacterium leprae* 18-kDa antigen against ovine footrot [76] was also tested. Though the animals were not protected from footrot, this live recombinant vaccine was capable of eliciting a humoral immune response, and it may be capable of successfully delivering a foreign antigen.

Recently, the immune responses of sheep vaccinated with a DNA vaccine expressing the extracellular domain of bovine CTLA-4, fused to HIg and a genetically detoxified phospholipase D (boCTLA-4-HIg- $\Delta$ PLD) from *C. pseudotuberculosis* have been investigated [22]. CTLA-4 binds with high affinity to the B7 membrane antigen on antigen-presenting cells (APC), enhancing the humoral immune response to a vaccine antigen. Though the genetically attenuated vaccine was found to be only partially effective against experimental challenge with *C. pseudotuberculosis*, the targeted DNA vaccine provided sheep with a significantly improved antibody response. In order to improve the efficacy of this DNA vaccine, De Rose et al. [31] tested different routes of immunization: (i) intramuscular DNA injection, (ii) subcutaneous DNA injection and (iii) gene gun bombardment. Intramuscular vaccination gave a level of protection similar to that observed with protein vaccination, while subcutaneous and gene gun vaccination did not protect sheep against bacterial challenge.

## 5. DETERMINANTS OF VIRULENCE

### 5.1. Phospholipase D

Phospholipase D (PLD) is a potent exotoxin produced by *C. pseudotuberculosis* and it has been considered as the major virulence factor for this bacterium [51, 65].

This exotoxin is a permeability factor that promotes the hydrolysis of ester bonds in sphingomyelin in mammalian cell membranes, possibly contributing to the spread of the bacteria from the initial site of infection to secondary sites within the host [19, 30, 65, 69, 89, 106, 108]. Moreover, it provokes dermonecrotic lesions, and at higher doses it is lethal to a number of different species of laboratory and domestic animals [34, 102]. Damage and destruction of caprine macrophages have been observed during infection with *C. pseudotuberculosis*.

This lethal effect is due to action of PLD [109].

Several of the biological activities of *C. pseudotuberculosis* PLD, as well as its molecular structure, have also been found in sphingomyelinases in the venom of the medically important spider genus *Loxosceles* [7, 10, 30, 102, 108, 112].

The use of an antitoxin has prevented the spread of *C. pseudotuberculosis* within the host; however, it is not able to prevent the development of abscesses [114]. Moreover, vaccination of goats with formalized exotoxin, i.e. with inactive PLD, also prevented the spread of bacteria, following experimental challenge [13].

### 5.2. Toxic cell-wall lipids

The surface lipids of *C. pseudotuberculosis* have long been described as major factors contributing to its pathogenesis [18, 47, 48, 58]. The toxicity of the extracted lipid material has been demonstrated by the induction of hemorrhagic necrosis following intradermal injection in guinea pigs [58]. Mouse peritoneal macrophages were found to be highly susceptible to the necrotizing action of *C. pseudotuberculosis* surface lipids, but this cytotoxic effect is not observed in rabbit cells [48]. However, infection with *C. pseudotuberculosis* in the guinea pig invariably progresses until death, while guinea pig macrophages are not susceptible to the cytotoxic action of the bacterial lipids [48, 57]. Tashjian et al. [109] observed that *C. pseudotuberculosis* was resistant to killing and digestion by caprine macrophages due to its lipid coat.

A study carried out in mice with 25 isolates of *C. pseudotuberculosis* proposed that there is a direct relationship of the percentage of surface lipids with the induction of chronic abscessation [78].

### 5.3. New candidates

Recently, it has been proposed that a putative *C. pseudotuberculosis* iron uptake

gene cluster has a role in its virulence [9]. The four genes in this putative operon were identified downstream from the *pld* gene. They were designated as Fe acquisition genes (*fag*) *A*, *B*, *C* and *D*. Since *C. pseudotuberculosis* is an intracellular pathogen, this bacterium must be able to acquire iron from an environment in which this nutrient is scarce. Although there was no alteration in the utilization of iron by a *fagB(C)* mutant in vitro, this mutant had a decreased ability to survive and to cause abscesses in experimentally-infected goats [9].

## 6. MOLECULAR STRATEGIES FOR THE STUDY OF VIRULENCE IN *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

### 6.1. Identification of immunodominant peptides

To date, the most widely studied *C. pseudotuberculosis* protein is PLD. It has already been purified, cloned and expressed in *E. coli* [34, 50, 69, 101].

A protective antigen, corynebacterial secreted protease 40 (CP40) [115], has been identified in *C. pseudotuberculosis* by applying a strategy that involves the local immune response, analyzing the specificity of antibodies produced by B cells [113]. Antibody secreting cells (ASC), obtained from induced infections in sheep, produce antibodies with high specificity. These antibodies are used as probes to screen whole-cell antigens of *C. pseudotuberculosis* by immunoblots. CP40 was one of the earliest antigens recognized in immunoblots of sera. ELISA tests confirmed the results obtained with immunoblots, and field trials with this semipurified antigen showed that CP40 was highly protective against experimentally-induced CLA [113].

Some researchers have analyzed and characterized soluble and insoluble proteins that have immunodominant potential [12, 79]. Though many other immunogenic excreted-secreted components have been

described, using immunoblot techniques [86, 87], these proteins have not been identified. However, they reliably detected CLA infection in goats, and they could be used as vaccine components.

## 6.2. Generation of mutants

Random chemical mutagenesis, with formic acid, was used by Haynes et al. [49] to produce enzymatically-inactive PLD. This analog protein, though inactive, still had immunological activity [49]. Hodgson et al. [51] and McNamara et al. [68] used site-specific mutagenesis to produce *pld* mutants that had reduced ability to establish infection and were unable to disseminate in sheep and goats.

Site-specific amino acid substitution has also been used to generate genetic inactivation of the *pld* gene in two independent experiments. Tachedjian et al. [106] substituted the His20 in the PLD active site with other amino acids, obtaining mutants that were able to produce a genetically-inactivated version of PLD. After analysis of mutant gene expression, two mutants were selected that retained features useful for toxoid vaccine development. In another study, the inactivated protein, in which His20 was substituted by Ser, gave 44% protection in sheep challenged with the bacterium [52].

A mutant of the *C. pseudotuberculosis* *recA* gene was generated by site-specific inactivation [92]. The mutant had its homologous recombination efficiency decreased 8–10 fold. Nevertheless, in vivo analysis revealed that the mutated *recA* gene did not affect the virulence of this bacterium in mice.

Reduction of virulence of *C. pseudotuberculosis* mutants was obtained by Simmons et al. [98]. Allelic exchange was used to generate *aroQ*-attenuated mutants that were unable to cause CLA in murine models. It was suggested that highly attenuated *aroQ* mutants of *C. pseudotuberculosis* could be used as vaccine vectors [99].

The ability of the *fag* genes to be induced by limited iron was studied by transcriptional fusions with the *lacZ* reporter gene, followed by an assay for  $\beta$ -galactosidase activity [9]. The resultant mutants were grown in both iron-rich and iron-limited media. The mutants expressed very low levels of  $\beta$ -galactosidase activity in iron-rich medium and almost three-fold more in iron-limited medium. Although not well expressed in vitro, this putative operon appears to be induced by limited iron.

Our research group has identified 34 insertional mutants of genes coding for fimbrial and transport subunits, and also for hypothetical and unknown function proteins from *C. pseudotuberculosis*, using random transposon mutagenesis with the TnFuZ transposition system [42], a tool that generates transcriptional and translational fusions with the *phoZ* gene (encoding alkaline phosphatase) of *Enterococcus faecalis*<sup>1</sup>. This discovery indicates promising target genes that could contribute to the development of attenuated vaccine strains.

## 7. FUTURE DIRECTIONS

Despite the various molecular strategies that have been employed, efficient tools for the genetic study of *C. pseudotuberculosis* are still scarce. In fact, the main reason for the lack of molecular investigation of this organism is that the genetics of the genus have been little studied with modern techniques, making it difficult to identify and characterize factors that could be involved in virulence [20]. Nevertheless, other representatives of the CMN group are better characterized, and the genetic tools that have been developed could be directly applicable to *C. pseudotuberculosis* in future studies.

---

<sup>1</sup> Dorella F.A., Estevam E.M., Pacheco L.G.C., Guimarães C.T., Lana U.G.P., Gomes E.A., Miyoshi A., Azevedo V., unpublished results.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Miyoshi A. and Azevedo V. share the same credit in the senior authorship of this work. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos-01.04.760.00) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil).

## REFERENCES

- [1] Adamson P.J., Wilson W.D., Hirsh D.C., Baggot J.D., Martin L.D., Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents, *Am. J. Vet. Res.* 46 (1985) 447–450.
- [2] Al-Rawashdeh O.F., al-Qudah K.M., Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47 (2000) 287–293.
- [3] Arsenaault J., Girard C., Dubreuil P., Daignault D., Galarneau J.-R., Boisclair J., Simard C., Bélanger D., Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, *Prev. Vet. Med.* 59 (2003) 67–81.
- [4] Augustine J.L., Renshaw H.W., Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 713–715.
- [5] Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G., Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications, *J. Biotechnol.* 104 (2003) 55–56.
- [6] Ben Said M.S., Ben Maitigue H., Benzarti M., Messadi L., Rejeb A., Amara A., Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis, *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 79 (2002) 51–57.
- [7] Bernheimer A.W., Campbell B.J., Forrester L.J., Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Science* 228 (1985) 590–591.
- [8] Biberstein E.L., Knight H.D., Jang S., Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Rec.* 89 (1971) 691–692.
- [9] Billington S.J., Esmay P.A., Songer J.G., Jost B.H., Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 208 (2002) 41–45.
- [10] Binford G.J., Cordes M.H.J., Wells M.A., Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure, *Toxicon* 45 (2005) 547–560.
- [11] Binns S.H., Bairley M., Green L.E., Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999, *Vet. Rec.* 150 (2002) 263–268.
- [12] Braithwaite C.E., Smith E.E., Songer J.G., Reine A.H., Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Microbiol.* 38 (1993) 59–70.
- [13] Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L., Morse S.M., Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 1116–1119.
- [14] Brown C.C., Olander H.J., Alves S.F., Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil, *Can. J. Vet. Res.* 51 (1987) 46–49.
- [15] Buck G.A., Cross R.E., Wong T.P., Loera J., Groman N., DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages, *Infect. Immun.* 49 (1985) 679–684.
- [16] Burrell D.H., A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin, *Res. Vet. Sci.* 28 (1980) 234–237.
- [17] Buxton A., Fraser G., *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, 1977, pp. 177–183.
- [18] Carne H.R., Kater J.C., Wickham N., A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*, *Nature* 178 (1956) 701–702.
- [19] Carne H.R., Onon E.O., Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, *Nature* 271 (1978) 246–248.
- [20] Cerdeño-Tárraga A.M., Efstratiou A., Dover L.G., Holden M.T.G., Pallen M., Bentley S.D., et al., The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 6516–6523.
- [21] Çetinkaya B., Karahan M., Atil E., Kalin R., De Baere T., Vanechoutte M., Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR, *Vet. Microbiol.* 2359 (2002) 1–9.
- [22] Chaplin P.J., De Rose R., Boyle J.S., McWaters P., Kelly J., Tennent J.M., Lew A.M., Scheerlinck J.-P.Y., Targeting improves the efficacy of a

- DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6434–6438.
- [23] Cianciotto N., Groman N., A beta-related corynebacteriophage which lacks a *tox* allele but can acquire it by recombination with phage, *Infect. Immun.* 49 (1985) 32–35.
- [24] Cianciotto N., Rappuoli R., Groman N., Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp., *J. Bacteriol.* 168 (1986) 103–108.
- [25] Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., et al., Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537–544.
- [26] Collins M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E., Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 128 (1982) 2503–2509.
- [27] Collins M.D., Falsen E., Akervall E., Sjoden B., Alvarez A., *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. Nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 1449–1454.
- [28] Connor K.M., Quirie M.M., Baird G., Donachie W., Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 2633–2637.
- [29] Costa L.R.R., Spier S.J., Hirsh D.C., Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin, *Vet. Microbiol.* 62 (1998) 135–143.
- [30] Coyle M.B., Lipsky B.A., Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, *Clin. Microbiol. Rev.* 3 (1990) 227–246.
- [31] De Rose R., Tennent J., McWaters P., Chaplin P.J., Wood P.R., Kimpton W., Cahill R., Scheerlinck J.P., Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90 (2002) 55–63.
- [32] Dercksen D.P., ter Laak E.A., Schreuder B.E., Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in The Netherlands, *Vet. Rec.* 138 (1996) 237.
- [33] Dercksen D.P., Brinkhof J.M.A., Dekker-Nooren T., van Maanen K., Bode C.F., Baird G., Kamp E.M., A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats, *Vet. Microbiol.* 75 (2000) 167–175.
- [34] Egen N.B., Cuevas W., McNamara P.J., Sammons D.W., Humphreys R., Songer J.G., Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, *Am. J. Vet. Res.* 50 (1989) 1319–1322.
- [35] Fernández E.P., Vela A.I., Las Heras A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F., Moreno M.A., Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis, *Int. J. Antimicrob. Agents* 18 (2001) 571–574.
- [36] Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., et al., Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5479–5490.
- [37] Foley J.E., Spier S.J., Mihalyi J., Drazenovich N., Leutenegger C.M., Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses, *Am. J. Vet. Res.* 65 (2004) 1734–1737.
- [38] Fsihi H., Cole S.T., The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 909–919.
- [39] Funke G., Lawson P.A., Collins M.D., Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 735–739.
- [40] Garg D.N., Nain S.P.S., Chandiramani N.K., Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats, *Indian Vet. J.* 62 (1985) 805–808.
- [41] Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., et al., The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 7877–7882.
- [42] Gibson C.M., Caparon M.G., Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 928–932.
- [43] Goodfellow M., Suprageneric classification of actinomycetes, in: Williams S.T. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, pp. 2333–2343.
- [44] Groman N., Schiller J., Russell J., *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from coryneophage  $\beta$  and *Corynebacterium*

- diphtheriae*, *Infect. Immun.* 45 (1984) 511–517.
- [45] Hall V., Collins M.D., Hutson R.A., Lawson P.A., Falsen E., Duerden B.I., *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 1065–1068.
- [46] Hard G.C., Electron microscopy examination of *Corynebacterium ovis*, *J. Bacteriol.* 97 (1969) 1480–1485.
- [47] Hard G.C., Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, *J. Med. Microbiol.* 5 (1972) 483–491.
- [48] Hard G.C., Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages, *Infect. Immun.* 12 (1975) 4139–4149.
- [49] Haynes J.A., Tkalcevic J., Nisbet I.T., Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Gene* 119 (1992) 119–121.
- [50] Hodgson A.L., Bird P., Nisbet I.T., Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 1256–1261.
- [51] Hodgson A.L.M., Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., Radford A.J., Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, *Infect. Immun.* 60 (1992) 2900–2905.
- [52] Hodgson A.L., Carter K., Tachedjian M., Krywult J., Corner L.A., McColl M., Cameron A., Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D, *Vaccine* 17 (1999) 802–808.
- [53] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., Irregular, nonsporulating Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994, p. 593.
- [54] Hou X.-G., Kawamura Y., Sultana F., Hirose K., Miyake M., Otsuka Y., Misawa S., Oguri T., Yamamoto H., Ezaki T., Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 453–460.
- [55] Ikeda M., Nakagawa S., The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 99–109.
- [56] Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M., The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 14925–14930.
- [57] Jolly R.D., The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice, *N. Z. Vet. J.* 13 (1965) 141–147.
- [58] Jolly R.D., Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, *J. Appl. Bacteriol.* 29 (1966) 189–196.
- [59] Jones D., Collins M.D., Irregular, nonsporulating Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, pp. 1261–1282.
- [60] Judson R., Songer J.G., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents, *Vet. Microbiol.* 27 (1991) 145–150.
- [61] Khamis A., Raoult D., La Scola B., rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 3925–3931.
- [62] Khamis A., Raoult D., La Scola B., Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 1934–1936.
- [63] Kim B.J., Lee S.H., Lyu M.A., Kim S.J., Bai G.H., Kim S.J., Chae G.T., Kim E.C., Cha C.Y., Kook Y.H., Identification of Mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1714–1720.
- [64] Kumar S., Tamura K., Nei M., MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150–163.
- [65] Lipsky B.A., Goldberger A.C., Tompkins L.S., Plorde J.J., Infections caused by non-diphtheria corynebacteria, *Rev. Infect. Dis.* 4 (1982) 1220–1235.
- [66] Literák I., Horváthová A., Jahnová M., Rychlík I., Skalka B., Phenotype and genotype of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats, *Small Rumin. Res.* 32 (1999) 107–111.
- [67] Liu D.T., Chan W.M., Fan D.S., Lam D.S., An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Br. J. Ophthalmol.* 89 (2005) 245–246.
- [68] McNamara P.J., Bradley G.A., Songer J.G., Targeted mutagenesis of the phospholipase D

- results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Mol. Microbiol. 12 (1994) 921–930.
- [69] McNamara P.J., Cuevas W.A., Songer J.G., Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology, Gene 156 (1995) 113–118.
- [70] Menzies P.I., Muckle C.A., The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks, Can. J. Vet. Res. 53 (1989) 313–318.
- [71] Menzies P.I., Hwang T.-I., Prescott J.F., Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats, Vet. Microbiol. 100 (2004) 129–137.
- [72] Merchant I.A., Packer R.A., The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), Veterinary bacteriology and virology, The Iowa State University Press, Iowa, 1967, pp. 425–440.
- [73] Mills A.E., Mitchell R.D., Lim E.K., *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis, Pathology 29 (1997) 231–233.
- [74] Mollet C., Drancourt M., Raoult D., *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification, Mol. Microbiol. 26 (1997) 1005–1011.
- [75] Moore R.J., Rothel L., Krywult J., Radford A.J., Lund K., Hodgson A.L., Foreign gene expression in *C. pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector, Vaccine 18 (2000) 487–497.
- [76] Moore R.J., Stewart D.J., Lund K., Hodgson A.L., Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic protease antigen, FEMS Microbiol. Lett. 194 (2001) 193–196.
- [77] Muckle C.A., Gyles C.L., Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Can. J. Comp. Med. 46 (1982) 206–208.
- [78] Muckle C.A., Gyles C.L., Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice, Am. J. Vet. Res. 44 (1983) 1149–1153.
- [79] Muckle C.A., Menzies P.I., Li Y., Hwang Y.T., van Wesenbeeck M., Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vet. Microbiol. 30 (1992) 47–58.
- [80] Navas J., Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes, Microbiologia 12 (1996) 297–304.
- [81] Nishio Y., Nakamura Y., Kawarabayasi Y., Usuda Y., Kimura E., Sugimoto S., Matsui K., Yamagishi A., Kikuchi H., Ikeo K., Gojobori T., Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*, Genome Res. 13 (2003) 1572–1579.
- [82] Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R., Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, Can. J. Vet. Res. 66 (2002) 86–92.
- [83] Paton M.W., Rose I.R., Hart R.A., Sutherland S.S., Mercy A.R., Ellis T.M., Dhaliwal J.A., New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production, Aust. Vet. J. 71 (1994) 47–49.
- [84] Paton M.W., Sutherland S.S., Rose I.R., Hart R.A., Mercy A.R., Ellis T.M., The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep, Aust. Vet. J. 72 (1995) 266–269.
- [85] Paton M.W., Walker S.B., Rose I.R., Watt G.F., Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks, Aust. Vet. J. 81 (2003) 91–95.
- [86] Paule B.J.A., Azevedo V., Regis L.F., Carminati R., Bahia C.R., Vale V.L.C., Moura-Costa L.F., Freire S.M., Nascimento I., Schaer R., Goes A.M., Meyer R., Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting, Vet. Immunol. Immunopathol. 96 (2003) 129–139.
- [87] Paule B.J.A., Meyer R., Moura-Costa L.F., Bahia C.R., Carminati R., Regis L.F., Vale V.L.C., Freire S.M., Nascimento I., Schaer R., Azevedo V., Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Protein Expr. Purif. 34 (2004) 311–166.
- [88] Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V., Bannantine J.P., Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 2675–2681.
- [89] Peel M.M., Palmer G.G., Stacpoole A.M., Kerr T.G., Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review, Clin. Infect. Dis. 24 (1997) 185–191.

- [90] Pepin M., Boisrame A., Marly J., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains, *Ann. Rech. Vet.* 20 (1989) 111–115.
- [91] Piontkowski M.D., Shivvers D.W., Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 (1998) 1765–1768.
- [92] Pogson C.A., Simmons C.P., Strugnell R.A., Hodgson A.L.M., Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development, *FEMS Microbiol. Lett.* 142 (1996) 139–145.
- [93] Prescott J.F., Menzies P.I., Hwang Y.T., An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock, *Vet. Microbiol.* 88 (2002) 287–297.
- [94] Puech V., Chami M., Lemassu A., Lan  elle M.-A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daff   M., Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane, *Microbiology* 147 (2001) 1365–1382.
- [95] Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Pr  vost G., Jehl F., Christen R., Monteil H., Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1995) 271–276.
- [96] Saitou N., Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [97] Selim A.S., Oedematous skin disease of buffalo in Egypt, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48 (2001) 241–258.
- [98] Simmons C.P., Hodgson A.L.M., Strugnell R.A., Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3048–3056.
- [99] Simmons C.P., Dunstan S.J., Tachedjian M., Krywult J., Hodgson A.L., Strugnell R.A., Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 474–479.
- [100] Songer J.G., Beckenbach K., Marshall M.M., Olson G.B., Kelley L., Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 49 (1988) 223–226.
- [101] Songer J.G., Libby S.J., Iandolo J.J., Cuevas W.A., Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 58 (1990) 131–136.
- [102] Songer J.G., Bacterial phospholipases and their role in virulence, *Trends Microbiol.* 5 (1997) 156–160.
- [103] Stanford K., Brogden K.A., McClelland L.A., Kozub G.C., Audibert F., The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines, *Can. J. Vet. Res.* 62 (1998) 38–43.
- [104] Sutherland S.S., Ellis T.M., Mercy A.R., Paton M., Middleton H., Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, *Aust. Vet. J.* 64 (1987) 263–266.
- [105] Sutherland S.S., Hart R.A., Buller N.B., Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms, *Vet. Microbiol.* 49 (1996) 1–9.
- [106] Tachedjian M., Krywult J., Moore R.J., Hodgson A.L., Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene, *Vaccine* 13 (1995) 1785–1792.
- [107] Takahashi T., Mori Y., Kobayashi H., Ochi M., Kikuchi N., Hiramune T., Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 649–655.
- [108] Tambourgi D.V., Da Silva M.S., Billington S.J., Goncalves De Andrade R.M., Magnoli F.C., Songer J.G., Van Den Berg C.W., Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases, *Immunology* 107 (2002) 93–101.
- [109] Tashjian J.J., Campbell S.G., Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 690–693.
- [110] ter Laak E.A., Bosch J., Bijl G.C., Schreuder B.E., Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep, *Am. J. Vet. Res.* 53 (1992) 1125–1132.
- [111] Vanechoutte M., Riegel P., de Briel D., Monteil H., Verschraegen G., De Rouck A., Claeys G., Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus



- Corynebacterium*, Res. Microbiol. 146 (1995) 633–641.
- [112] van Meeteren L.A., Frederiks F., Giepmans B.N.G., Pedrosa M.F.F., Billington S.J., Jost B.H., Tambourgi D.V., Moolenaar W.H., Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine, J. Biol. Chem. 279 (2004) 10833–10836.
- [113] Walker J., Jackson H.J., Eggleton D.G., Meeusen E.N.T., Wilson M.J., Brandon M.R., Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis, Infect. Immun. 62 (1994) 2562–2567.
- [114] Williamson L.H., Caseous lymphadenitis in small ruminants, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17 (2001) 359–371.
- [115] Wilson M.J., Brandon M.R., Walker J., Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kDa antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Infect. Immun. 63 (1995) 206–211.
- [116] Yeruham I., Braverman Y., Shpigel N.Y., Chizov-Ginzburg A., Saran A., Winkler M., Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies, Vet. Q. 18 (1996) 87–89.
- [117] Yeruham I., Friedman S., Perl S., Elad D., Berkovich Y., Kalgard Y., A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd, Vet. Dermatol. 15 (2004) 315–320.
- [118] Zaki M.M., The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection, Res. Vet. Sci. 9 (1968) 489–493.

**Capítulo II** – Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Reviews of Vaccine*, 8(2) :205-213 (2009).

Desde o início dos trabalhos do LGCM com *C. pseudotuberculosis*, em 2003, nosso grupo contribuiu com a publicação de nove artigos na área. Essa visibilidade conquistada fez com que, em 2008, fôssemos convidados pelo editor da Revista “*Expert Reviews of Vaccine*” para contribuir com um artigo de revisão.

Neste trabalho, recém publicado, focamos no assunto de interesse da presente tese: o desenvolvimento de novas vacinas contra a LC. Abordamos a interação parasita-hospedeiro e a resposta imune do hospedeiro à infecção; procuramos por trabalhos que descrevessem antígenos imunodominantes (visando o desenvolvimento de diagnósticos) e protetores (visando o desenvolvimento de vacinas); citamos as principais vacinas disponíveis no mercado, bem como suas vantagens e desvantagens e os esforços científicos na busca por uma vacina ideal. E ainda, tecemos comentários sobre o futuro da caprino e ovinoculturas tendo em vista a procura por novas alternativas vacinais, tratamentos e diagnósticos para a LC.

For reprint orders, please contact [reprints@expert-reviews.com](mailto:reprints@expert-reviews.com)

EXPERT  
REVIEWS

# Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development

*Expert Rev. Vaccines* 8(2), 205–213 (2009)

Fernanda A Dorella,  
Luis GC Pacheco,  
Núbia Seyffert,  
Ricardo W Portela,  
Roberto Meyer,  
Anderson Miyoshi\* and  
Vasco Azevedo<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Author for correspondence

Laboratório de Genética  
Celular e Molecular,  
Departamento de Biologia  
Biológicas, Universidade Federal  
de Minas Gerais, CP: 486  
CEP: 31 270-901, Belo  
Horizonte – MG, Brazil  
Tel.: +55 313 409 2610  
Fax: +55 313 409 2610  
[vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br)

\*Both authors contributed  
equally to this manuscript

*Corynebacterium pseudotuberculosis* continues to cause considerable economic losses in ovine and caprine herds worldwide, causing caseous lymphadenitis. Nevertheless, the immunology of this disease is relatively unknown. Novel antigens may provide vaccines that are more effective and improve diagnostic methods for better control of this disease. The available commercial vaccines are not able to fully protect susceptible animals, cannot be used in all host species and are not licensed for use in many countries. Recent studies on the genomics of *C. pseudotuberculosis* and on its molecular determinants of virulence should bring us new alternatives for more effective vaccine formulations.

**KEYWORDS:** caseous lymphadenitis • cheesy gland • *Corynebacterium pseudotuberculosis* • diagnostic • goat  
• immunodominant antigen • immunology • phospholipase D • sheep • vaccine

Caseous lymphadenitis (CLA), or ‘cheesy gland disease’, is a chronic debilitating infection of sheep and goats caused by the Gram-positive bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*. This disease is distributed globally and has been identified in Europe, Oceania, North and South America, Asia and Africa [1,2]. In countries such as Australia, New Zealand, the UK, Canada, the USA and Brazil [2–7], CLA has a severe economic impact on the sheep and goat industries, owing to reduction in wool, meat and milk production and also resulting in the condemnation of carcasses and skins affected with cheesy gland in slaughterhouses [8].

The main symptoms of CLA include the formation of abscesses in the superficial lymph nodes (e.g., the parotid and submandibular lymph nodes) or internally (most frequently in the lungs and in the mediastinal lymph nodes) [8]. These two manifestations of CLA can occur concomitantly, as was observed in a recent study by O’Reilly *et al.*, who reported on the dynamics of infection by *C. pseudotuberculosis* in sheep flocks, with an initial epidemic of superficial abscesses, followed by increasing frequencies of respiratory abscesses, which became more frequent in the endemic phase [9].

Once established in a herd, treatment of CLA has proven difficult to eradicate because it is generally refractory to antibiotic therapy. Although there have been recent reports of successful treatment of diseased sheep and goats using antibiotics [10,11], this strategy is not normally considered as the most viable for controlling CLA [12]. Management measures, including disinfection of containment fencing, warehouses, shears and containment stalls after contact with animals, are highly recommended [1,12]. Nevertheless, there appears to be a consensus that vaccination combined with detection/isolation of infected animals is the most reliable strategy for controlling this disease [1,3,8]. More drastic measures have been suggested, such as culling animals with lesions or those that test positive in diagnostic tests. However, such tests may result in false positives, resulting in wasteful elimination of noninfected animals [13]. Nevertheless, the sacrifice of both seropositive and seronegative animals may be beneficial in endemic zones [14]. As these radical measures are generally inefficient, control of this disease should be based on strategies that prevent contamination of breeding stock, to avoid dissemination. Consequently, research on better detection methods and more effective vaccine formulations should be given priority.

### Basis for a CLA vaccine: an overview of pathogenesis & the host immune response to *C. pseudotuberculosis* infection

The details of the immune process against *C. pseudotuberculosis* infection are not completely understood and effective vaccines are still lacking. The evolution of experimental infection by *C. pseudotuberculosis* in superficial granulomas in sheep can be divided into two major steps: the early phase, when the recruitment of phagocytic cells to the infection site occurs, which in some cases may lead to the elimination of the pathogen; and the second phase, when there is a recruitment of macrophages and lymphocytes to the inflammatory site owing to bacterial persistence, leading to a focal lesion [15].

Extensive and thorough studies were carried out, mainly between the 1960s and 1980s, in order to understand the initial contact between *C. pseudotuberculosis* and the host [15–44]. Although this research was carried out with various hosts, we can put together a chronology of infection. The course of events in an infected sheep or goat, with minor differences, appears to be similar to that which occurs in artificially infected mice. Briefly, upon entry into the host, which generally occurs via the mucosa or skin wounds, *C. pseudotuberculosis* spreads quickly to the closest draining lymph node, in a process that depends on its ability to colonize phagocytes, resist the phagolysosome compartment and provoke cell death, releasing more bacteria and generating a necrotic lesion.

As soon as 3 min after intraperitoneal inoculation of the bacteria in mice, rapid engulfment in phagocytic vacuoles was observed [16]. After 1 h following infection of caprine macrophages, 60–80% of the cells contained bacteria [17]. After 2 h, acid phosphatase was present in all vesicles containing bacteria [17]. A strong local reaction was apparent 4 h after challenge in ewes [18]. A few hours later, many of the resident macrophages were degenerating and a massive polymorphonuclear leukocyte infiltration, which had incorporated a large number of the bacteria, could be observed [15,16,19].

Using expression of the *gfp* gene as a marker in *C. pseudotuberculosis*, McKean *et al.* demonstrated, through fluorescence microscopy, that the number of bacteria increases within macrophages after infection, suggesting replication inside this type of cell [20]. Hard demonstrated that stimulated peritoneal macrophages can increase the capacity to destroy this bacterium and to withstand its cytotoxic effects [16]. Engulfed bacteria were found at the edges of the cells, close to small groups of primary lysosomes. Degenerating phagocytes contained apparently viable bacteria. Fusion of phagocytes containing bacteria with lysosomes was observed at this stage, in caprine macrophage infection [17].

At 20 h, 90% of the caprine macrophage population had been lysed and many extracellular bacteria could be observed by electron microscopy [17]. Pronounced changes in macrophage and phagolysosome membranes and in nuclei and the cell edge, were found at this stage [21]. Live macrophages display numerous membrane-bound inclusions within the cytoplasm [16]. Hard suggested that these changes in structure are due to the action of toxic lipids produced by *C. pseudotuberculosis*; lysosomal membranes are implicated as one of the main targets of endotoxin-induced injury [21]. These toxic lipids of the cell-wall surface

protect *C. pseudotuberculosis* from destruction by phagocytic cells and induce hemorrhagic necrosis and chronic abscesses in the host [1,17,21–23], but they do not appear to play any role in inducing immunity [24]. Another *C. pseudotuberculosis*-secreted toxin, phospholipase D (PLD), hydrolyzes ester linkages in the cell membrane's sphingomyelin and contributes to the spread of bacteria from the initial site of infection, besides having cytotoxic and dermonecrotic activity [1,22,23,25,26].

By the third day of infection in mice, the lesions had increased in size and neutrophil components, with fewer eosinophils. The developing endoplasmic reticulum increases and reticulome-like granule clusters in cells are observed more frequently [16]. The largest lesions tend to develop into abscesses, while smaller ones, in which polymorph debris and a strong mononuclear reaction are noted, tend to resolve. The macrophages take on an elongated fibroblastic appearance, also called epithelioid cells [27]. By the fourth day after inoculation, many macrophages had taken on a mature form, with marked differences compared with an unstimulated cell, including increases in cell size, in granular endoplasmic-reticulum content and in size and number of lysosomes [16]. The resultant pyogranulomatous reactions coalesce to form larger granulomas, which then become encapsulated [22,28,29]. Brown *et al.* conducted a histological study of visibly altered lymph nodes of infected goats [25]. They observed that the superficial lymph nodes had an extensive central mass that contained dead and dying macrophages and eosinophils, surrounded by a layer of fibrous tissue with aggregates of lymphocytes, associated with bacterial dissemination. This is considered a typical granulomatous lesion. Gram-positive coccobacilli are seen scattered throughout the central necrotic mass.

One source described that subacute disease occurred approximately during days 6–14 after infection; there was transient hyperthermia and a strong local inflammatory reaction [30], where some deaths were observed. A fibrous capsule is observed to surround the lesion by day 12 [28]. Walker *et al.* found lymphocytes inside encapsulated lesions and also found debris and intact MHC class II cells in the central necrotic mass [31]. They found a high concentration of CD5<sup>+</sup> (pan-T) cells surrounding this region, with CD4 and CD8 cells distributed throughout the lymphoid tissue. There was a high concentration of CD8<sup>+</sup> T cells inside the CLA lesions. This could be part of an antibacterial protective mechanism to contain the dissemination of infected macrophages [32]. Generally, in immature lesions, CD4<sup>+</sup> T cells predominate; and mature lesions have increased the numbers of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes [28]. The pyogranulomas of *C. pseudotuberculosis* appear to have a pattern of lesions similar to those induced by mycobacteria, such as *Mycobacterium leprae* [15,28].

As *C. pseudotuberculosis* is a facultative intracellular pathogen that can replicate within phagocytic cells, cellular immunity is believed to be necessary for effective protection. The role of the macrophage in the development of cellular immunity is well recognized [16]; several studies have demonstrated that primary responses against *C. pseudotuberculosis* in hosts are complex and require both cellular interactions and those mediated by cytokines, leading to protection and enhanced immune status in sheep [33,34].

Specific corynebacterial antigens that elicit immune responses in infected and vaccinated animals have been identified. Many *C. pseudotuberculosis* antigens are recognized by sera from naturally infected sheep and from experimentally infected goats [35,36].

Paule *et al.* observed a strong humoral response beginning approximately 6–11 days postinfection [36]. They also found short-lived primary production of IFN- $\gamma$  in infected goats, followed by secondary strong and long-lasting production of this cytokine [36]. A similar profile of IFN- $\gamma$  production by sheep and goats infected with *C. pseudotuberculosis* was found in other studies [37,38], corroborating the concept that IFN- $\gamma$  is essential for the control of infection with this bacterium; this was postulated in previous studies made with mice [34,39–41].

Pépin *et al.* evaluated the cytokine expression profile in experimentally infected sheep; they demonstrated that inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, are produced mainly at the site of *C. pseudotuberculosis* inoculation, whereas T-cell-associated cytokines (e.g., IFN- $\gamma$ ) are expressed mainly at the draining lymph nodes [26]. Moreover, they postulated that the pathogenesis of ovine CLA is associated with the production of cytokines at the pyogranuloma level. A recent study analyzed the acute-phase proteins produced in response to inflammatory cytokines that are secreted in response to *C. pseudotuberculosis* infection in sheep [42]. Serum concentrations of haptoglobin, serum amyloid A and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein increased after infection; they then followed kinetics that are indicative of a switch in the production of inflammatory cytokines from an acute- to a chronic-phase disease pattern.

The cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  have been implicated in host resistance mechanisms to overcome primary *C. pseudotuberculosis* infection [39]. However, their role in secondary *C. pseudotuberculosis* infection is still unknown. Probably, these cytokines participate in protective immunity through the activation of macrophages [43,44]. Lan *et al.* found that IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are produced rapidly after a secondary infection; although they did not detect IL-4, suggesting that Th1 cells are important for the development of resistance of the host to secondary *C. pseudotuberculosis* infection [41].

In summary, immunity to *C. pseudotuberculosis* infection is a complex process that involves both the humoral and cellular arms of the immune system. It includes high-level production of antibodies against several bacterial antigens, including the toxin PLD and a changing cytokine environment during the course of infection.

### Research on immunodominant & protective *C. pseudotuberculosis* antigens

Several different techniques have been employed to isolate secreted, cell-surface and somatic fractions of *C. pseudotuberculosis* proteins in studies that have analyzed and characterized soluble and insoluble factors, in order to identify antigens with immunodominant and protective characteristics [45,46]. As the main *C. pseudotuberculosis* virulence factor, the PLD exotoxin is the most widely studied protein of this bacterium [22,23,47]. In immunoblots made with sera from naturally infected animals, PLD generates a strong reaction at around 31.5 kDa; this protein has phospholipase activity, as demonstrated by synergistic hemolysis assays [48]. Vaccination of goats

with formalized inactive exotoxin prevents the spread of *C. pseudotuberculosis* following experimental challenge, while administration of an antitoxin prevents dissemination of the bacteria within the host [25,49]. PLD has already been purified, cloned and expressed for use in recombinant vaccine formulations and for diagnostics [50–52]. Menzies *et al.* compared a commercial bovine IFN- $\gamma$ , whole-blood ELISA with recombinant PLD ELISA for diagnosis of *C. pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats [13]. Recombinant PLD ELISA detected infected animals with a reliability of 81% and noninfected animals with a reliability of 97%, being more predictive than the IFN- $\gamma$  ELISA.

Searching for immunodominant *C. pseudotuberculosis* antigens, Muckle *et al.* detected seven reactive proteins in whole-cell lysates with immune sera from 40 infected sheep and goats; three of these proteins were detected by all the sera [48]. Braithwaite *et al.* extracted detergent-solubilized whole cells of *C. pseudotuberculosis* and analyzed them by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [45]. They found more than 20 bands with high-molecular-mass proteins, ranging from 20 to 119 kDa, of which ten were recognized by antibodies present in the sera of naturally infected goats. SDS-PAGE analysis of ammonium sulphate-concentrated culture supernatants demonstrated more than seven bands, with molecular masses of 14–64 kDa, of which five reacted with the goat sera [45]. Paule *et al.* found 16 immunodominant *C. pseudotuberculosis* proteins, with molecular weights ranging from 24 to 125 kDa, which reacted strongly with a pool of sera from naturally infected goats; most of the immunoreactive antigens were observed in the secreted fraction [46]. They also found higher production of IFN- $\gamma$  in cultures of whole blood cells from infected goats that were stimulated with secreted compared with somatic bacterial antigens [37,46].

Inactivated whole-cell *C. pseudotuberculosis* has long been used for developing diagnostic methods and vaccines aiming to control and eradicate CLA [22]; but the results are still unsatisfactory. *C. pseudotuberculosis* cell-associated antigens can also protect against CLA and may be essential for the induction of optimal immunity [53]. An antigenic *C. pseudotuberculosis*-secreted 40-kDa protease (CP40) is recognized by the sera of infected animals during early infection. ELISA tests also confirmed that this secreted semipurified antigen is highly protective in experimentally infected animals. Although CP40 induces high levels of protection, the type of response generated by this protein, whether humoral or cellular, is still unknown [54].

Somatic proteins are mostly utilized in tests to determine if infection has been eradicated in herds and flocks. ELISA tests have been developed to detect IFN- $\gamma$  as a marker of cell-mediated immunity against *C. pseudotuberculosis* [55]. A whole-blood IFN- $\gamma$  enzyme immunoassay, developed with formalin-inactivated whole bacterial cells as an antigen, demonstrated a sensitivity of 91% and a specificity of 98% in naturally infected sheep [38].

Indirect ELISA tests that have been effective in detecting CLA have included several different antigen preparations, such as whole bacterial cells, purified toxin and secreted proteins [56–58]. Sandwich ELISA tests have been developed with the PLD toxin in order to improve sensitivity and specificity [57,59].

Immunogenic extracellular and somatic components of *C. pseudotuberculosis* have been described using various molecular tools; however, further studies are still necessary. A search for antigens of this species that are capable of inducing cellular immunity is an important step towards the development of improved diagnostic tests and more efficient vaccines.

### Finding a new CLA vaccine

Vaccines are administered to a large number of healthy animals in order to confer resistance to diseases; consequently, they must be safe for healthy animals, in addition to conferring immunoprophylaxis [60]. Considerable research has been conducted in an attempt to develop a vaccine that is effective in controlling CLA.

### Available commercial vaccines

Commercial vaccines for CLA are available in some countries. Generally, these vaccines are based on an inactivated cell-culture supernatant, PLD being the main component, combined with antigens from other pathogens, such as *Clostridium* [3,49,61]. A combined vaccine (Glanvac™) was released and subsequently became available in several countries [62]. Vaccination of sheep and goats with Glanvac has given significant protection against subsequent experimental infections with *C. pseudotuberculosis*, evidenced by a decrease in the number of lesions [50]. Another commercially available vaccine, Caseous D-T™, has two formulations: a one-component vaccine that contains clostridial toxoids and a two-component vaccine, which is a combination of *C. pseudotuberculosis* bacteria and toxoid. In a preliminary study, a two-component vaccine provided better protection against *C. pseudotuberculosis* infection than a one-component vaccine, reducing the incidence of both external and internal CLA lesions [63]. A combined toxoid vaccine against CLA resulted in a decrease in the number and size of CLA lung abscesses and decreased the spread of disease within a flock [64]. A live-attenuated vaccine of *C. pseudotuberculosis*, derived from strain 1002, has been commercially licensed for use in Brazil since 2000. This vaccine is based on a naturally low-virulence strain isolated in 1971. It is already being produced industrially and is available in both liquid and lyophilized forms; it must be administered yearly to sheep and goats by a subcutaneous route. This live vaccine has provided roughly 83.3% protection against CLA in goats in experimental assays [65,101].

Although they are useful, all of these vaccines have problems that should be considered before use. In a recent survey, 43% of Australian farmers administered commercial CLA vaccines; however, only 12% used them correctly [3]. It was concluded that adjustments in vaccination programs would dramatically lower the prevalence of CLA. Also, while the recommended vaccination program for sheep consists of two priming doses in lambs and yearly boosters in adult sheep, revaccination is recommended at 6-month intervals for goats. This need for two or more doses contributes enormously to the misuse of the vaccine by farmers, as the increase in the number of doses increases material and labor costs. We must also take into consideration the fact that the farmers did not receive proper training on the use and storage of the vaccine and the product instructions did not include clear

indications of how to adjust administration according to animal age and weight. To reduce such misuse, vaccines that require only a single dose are needed urgently [66]. Moreover, not all vaccines available for use in sheep have the same efficacy in goats. The side effects are more intense in goats, with increased clinical severity, fever, malaise, reductions in milk production and distribution of lesions. In addition, these vaccines are not licensed for use in all countries [3,49].

### Experimental vaccines

The search for an ideal vaccine against CLA, that is, a formulation able to induce strong and long-lasting protection to animals without provoking positive reactions in diagnostic tests, with no side effects and low production costs, has always been a priority for *C. pseudotuberculosis* research. Different strategies have been tested, including attenuated and killed bacteria [39,67], bacterial cell-wall fractions [68], culture supernatants and cell-free toxoids [62], recombinant proteins [50,52,69,70], DNA vaccines [71,72] and a mix of supernatant and cellular components [34,68]. They have afforded variable protection levels against experimental and natural infections, ranging from 38 to 98%; but their safety profile remains questionable, owing to undesirable side effects, such as abscessing of the inoculation site [22,54,66,73].

Pépin *et al.* reported that sheep infected experimentally with *C. pseudotuberculosis* were protected against further challenge, despite being unable to clear the original infection; moreover, these animals remained disease carriers [74]. An aromatic mutant (*aroQ*) of *C. pseudotuberculosis* was constructed by allelic exchange; its efficacy as a vaccine was tested in a murine model [39]. This strain was attenuated by introduction of the *aroQ* mutation and was able to protect animals against challenge. The capacity of this mutant to elicit a protective immune response was assessed in an ovine model [67]. All immunized sheep developed low levels of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> antibody response specific for *C. pseudotuberculosis* cell-associated antigens; and vaccination did not elicit adequate levels of TNF- $\alpha$ ; consequently, sheep were not protected against challenge.

The site-specific mutagenesis strategy was employed by Hodgson *et al.* to construct a PLD-negative mutant of *C. pseudotuberculosis* (Toxminus) [75]. This attenuated bacterium was evaluated as a vaccine candidate and for its potential as a live delivery vector. In vaccinated animals challenged with wild-type *C. pseudotuberculosis*, the number of abscessed animals and the severity of abscessation were diminished compared with the unvaccinated control, suggesting a strong protective immune response. However, although Toxminus stimulated both humoral and cellular responses, their levels were lower than those elicited by wild-type bacteria. The role of PLD in protection against *C. pseudotuberculosis* was evident from this experiment. PLD also appears to contribute to *in vivo* survival and induces a strong protective immune response. The promising results with Toxminus concerning its capacity to stimulate cell-mediated immunity and a humoral response led researchers to assess its potential as a live vaccine vector [66]. Toxminus expressing a genetically inactivated form of PLD has been used in oral sheep immunization. In contrast to the strong antibody response stimulated by a single oral dose of Toxminus, there was

no significant protection against challenge. Toxminus has been used as a live bacterial vector to deliver heterologous antigenic proteins [70]. Five heterologous genes plus a genetically inactivated analogue of PLD were expressed in a Toxminus strain and three proteins elicited specific antibody responses in experimentally vaccinated sheep. Expression by Toxminus of mature basic protease (*bprV*) of *Dichelobacter nodosus* fused to the carboxy terminus of *M. leprae* 18-kDa antigen was also tested against ovine footrot [76]; this live recombinant vaccine was capable of eliciting a humoral immune response to the basic recombinant protease antigen. It is evident that Toxminus is a successful live vaccine vector, not only against *C. pseudotuberculosis* infection, but also against other animal diseases.

By using antibody-secreting cell probes, obtained from a local immune response to infectious challenge with *C. pseudotuberculosis* in infected tissues, Walker *et al.* identified a 40-kDa antigen as one of the predominant antigens recognized postinfection in immunoblots, confirmed by ELISA [54]. After purification, this antigen, identified as a secreted serine protease termed CP40 [73], was tested subcutaneously at two doses (5 and 100 µg) in a sheep vaccination trial. Vaccination with 100 µg of CP40 antigen reduced the proportion of infected sheep by 82% and number of lung lesions by 98%; it also reduced the size of the lesions.

Sheep were vaccinated with a DNA vaccine expressing the extracellular domain of bovine cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA)-4, fused to human immunoglobulin, along with a genetically detoxified PLD (boCTLA-4-Hlg-ΔPLD) from *C. pseudotuberculosis*, in order to enhance the humoral response to the vaccine antigen [71]. Even though the genetically attenuated vaccine was found to be only partially effective against experimental challenge with *C. pseudotuberculosis*, the targeted DNA vaccine provided sheep with a significantly improved antibody response. This DNA vaccine was also used in a comparative study of different routes of vaccination [72]. Subcutaneous, intramuscular and gene-gun bombardment routes were tested and evaluated for their capacity to induce an immune response in sheep. After challenge, intramuscular vaccination induced 45% protection and increased IgG titers, mainly IgG<sub>2</sub>. Moreover, the intramuscular route induced a strong immunological memory.

Various components, including cell-wall proteins and toxins of *C. pseudotuberculosis* were used for alpaca immunization [68]. Animals vaccinated with toxin, at high or low doses, exhibited high and moderate protective immunity, respectively, suggesting a dose-dependent induction of protection. A cell wall-based vaccine induced a lower degree of protection against abscessation. Moura-Costa *et al.* evaluated the protective capacity of a naturally attenuated strain of *C. pseudotuberculosis* and its culture supernatant in diverse formulations [77]. Indirect ELISA demonstrated a higher humoral response and higher IFN-γ levels in animals vaccinated with culture supernatant than in animals inoculated with supernatant concentrated with the three-phase partitioning (TPP) method [78], associated with Freund's incomplete adjuvant and an oligodeoxynucleotide containing unmethylated CpG dinucleotides (CpG-ODN). However, these vaccinations did not

protect animals effectively against challenge. Attenuated T1 strain conferred the best protection results, although the level was only 33.3%, with a weak humoral response.

Several attributes are generally desirable for an effective vaccine [79,80]. Preferably, it should be single-dose, have a slow release and a rapid onset; it should be administered while there are still maternally derived antibodies. Most importantly, the vaccine should induce long-lasting or, if possible, complete immunity. The search for better methods to control CLA continues.

### Expert commentary

Infection of sheep and goats with *C. pseudotuberculosis* remains highly prevalent in many different countries and, as there has been an increase in demand for ovine and caprine products, especially in Brazil, the importance of this disease has increased [102].

Even though there is an apparent consensus regarding the implementation of vaccination programs, along with efficient detection/removal measures, as the best strategies to control CLA in a herd, a sufficiently effective vaccine and good diagnostic methods are still lacking. Use of currently available vaccines does not completely eliminate the disease; it only reduces incidence and severity. In addition, there are differences between the phenotypes of the disease according to animal species and the country where outbreaks occur, suggesting that a vaccine available in one country would not necessarily be effective and able to ensure the same degree of protection in another.

Enormous research efforts have recently been made in genomic and proteomic studies of *C. pseudotuberculosis* in order to develop more sensitive, specific, inexpensive and straightforward diagnostic methods to accurately detect subclinical infections by this bacterium [38,56,81]. In the near future, these tests will probably help to avoid the introduction of infected animals into healthy herds, which is especially important in endemic countries, such as Brazil. Many recent studies have concentrated on the molecular determinants of the virulence of *C. pseudotuberculosis*; such studies will lead to better knowledge regarding its pathogenicity and consequently to the development of more efficient vaccine formulations. These novel vaccines must also be cheap to produce and easy to administer, besides being useful both for sheep and goats, in order to make their utilization widespread.

### Five-year view

Before we can develop an ideal vaccine to combat CLA, we will need to have a deeper understanding of the host immune response against *C. pseudotuberculosis* infection, as well as of the complete set of molecular determinants of virulence used by this bacterium to cause disease. The multiorgan involvement of the disease caused by this intramacrophage parasite is strikingly similar in many respects to that found in human mycobacterial infections [82]. Although *Corynebacterium diphtheriae* is related to *C. pseudotuberculosis* phylogenetically, its behavior inside the host is very different, as *C. diphtheriae* is not an intracellular pathogen. Thus, information on *Mycobacterium* spp. can be used to help understand *C. pseudotuberculosis* immunity, mainly because they are both intracellular and the cell walls of these microorganisms are very

similar and are considered important virulence factors [83]. There have been no studies concerning the participation and importance of innate immunity mechanisms in response to *C. pseudotuberculosis*, such as Toll-like receptors and NOD-like receptors, which have been widely studied in *Mycobacterium* [84,85]. In contrast to mycobacterial infection, *C. pseudotuberculosis* does not avoid the fusion of phagosomes and lysosomes [86]; however, it is able to resist lysosomal enzymes [28].

Some studies that have searched for new determinants of virulence have brought good news. A recent report described the *fagBCD* operon, encoding a putative iron uptake system of *C. pseudotuberculosis*, an additional virulence factor of this bacterium [87]. Although there was no alteration in the utilization of iron by a *fagB(C)* mutant *in vitro*, this mutant had a decreased ability to survive and to cause abscesses in experimentally infected goats [87]. Consequently, *fagB* is a promising candidate for a *C. pseudotuberculosis* virulence gene. In a search for unknown virulence determinants, McKean *et al.* established a promoterless reporter gene system, pSM20, for *C. pseudotuberculosis*, through the expression of green fluorescent protein [20]. Using this reporter system, combined with the differential fluorescence induction strategy, these researchers were able to identify putative induced genes in macrophages, such as nonribosomal peptide synthetase (*cps*) and the  $\beta$ -chain of a propionyl CoA carboxylase (*pccB*), which exhibited high fluorescence inside macrophages. Within the same context, McKean *et al.* constructed a DNA macroarray using a cloned genomic DNA library, aiming at identifying genes that demonstrate differences in the transcript level after heat

shock (43°C) [47]. A total of 15 spots exhibited different intensities among the replica arrays. Among these, four genes were identified as being upregulated (*dnaK*, *dnaJ*, *hspR* and *clpB*) and three genes were strongly downregulated at 43°C (*pld*, *fagC* and *fus*). This observation suggests some details regarding PLD regulation:

- This protein is not necessary in all stages of disease;
- There is a possibility of *in vivo* regulation, which does not occur in the early stages of infection;
- PLD remains the main virulence factor of *C. pseudotuberculosis*.

The completion of *C. pseudotuberculosis* genome sequencing, by the Minas Gerais Genome Network, is expected by the beginning of 2009 [103]. This research brings new hope to goat and sheep producers, as it contributes information that will help to identify proteins related to this disease and will also be useful for developing a vaccine, as well as for new therapies and diagnostic kits.

#### Financial & competing interests disclosure

*This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, Financiadora de Estudos e Projetos-01.04.760.00 (FINEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

#### Key issues

- Caseous lymphadenitis (CLA) is an economically important disease that affects sheep and goats throughout the world.
- Phospholipase D (PLD) remains the main known *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence factor; it has been cloned and expressed for the development of CLA vaccines and for diagnosis procedures.
- Little is known regarding alternative *C. pseudotuberculosis* immunodominant proteins; this may partly be due to a lack of sequence data.
- ELISAs have been reported to be useful in CLA control programs and have included various preparations of antigens, including whole bacterial cells, PLD toxin and secreted proteins.
- The most efficient cost–benefit measure against the introduction of CLA in livestock is immunization.
- The effectiveness of commercial vaccines against CLA is highly compromised by their inappropriate use by farmers.
- Following the release of the *C. pseudotuberculosis* genome sequence, reverse vaccination strategies will help with the discovery of new gene targets to improve vaccine development.

#### References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

- 1 Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37, 201–218 (2006).
  - 2 Al-Rawashdeh OF, Al-Qudah KM. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in awassi sheep in Jordan. *J. Vet. Med. B* 47, 287–293 (2000).
  - 3 Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 81, 91–95 (2003).
  - 4 Connor KM, Quirie MM, Baird G, Donachie W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2633–2637 (2000).
  - 5 Ben Said MS, Ben Maitigue H, Benzarti M, Messadi L, Rejeb A, Amara A. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 79, 51–57 (2002).
- **Extensive study of caseous lymphadenitis (CLA) prevalence in Australia, demonstrating the importance of the correct implementation of vaccination programs against CLA to effectively control this disease in flocks.**



- 6 Binns SH, Bailey M, Green LE. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet. Rec.* 150, 263–268 (2002).
- 7 Arsenault J, Dubreuil P, Girard C, Simard C, Bélanger D. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev. Vet. Med.* 59, 125–137 (2003).
- 8 Fontaine MC, Baird GJ. *Caseous lymphadenitis*. *Small Rumin. Res.* 76, 42–48 (2008).
- 9 O'Reilly KM, Green LE, Malone FE, Medley GF. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev. Vet. Med.* 83, 242–259 (2008).
- 10 Senturk S, Temizel M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. *Vet. Rec.* 159, 216–217 (2006).
- 11 Ural K, Alic D, Haydardedeoglu AE *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Saanen×Kilis crossbred (White) goats in Ankara, Turkey and effective kanamycin treatment: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Small Rumin. Res.* 77, 84–88 (2008).
- 12 Baird G. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. *Vet. Rec.* 159, 500 (2006).
- 13 Menzies PI, Hwang Y-T, Prescott JF. Comparison of an interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 100, 129–137 (2004).
- 14 Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Clínica Veterinária. Um Tratado de Doenças Dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos (9th Edition)*. Koogan G (Ed.). Guanabara, Brazil (2002).
- 15 Guilloteau L, Pépin M, Pardon P, Le Pape A. Recruitment of 99m-technetium- or 111-indium-labelled polymorphonuclear leucocytes in experimentally induced pyogranulomas in lambs. *J. Leukocyte Biol.* 48, 343–352 (1990).
- 16 Hard GC. Electron microscopic study of the differentiation of mouse peritoneal macrophages stimulated by *Corynebacterium ovis* infection. *Lab. Invest.* 21, 309–315 (1969).
- 17 Tashjian JJ, Campbell SG. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.* 44, 690–693 (1983).
- 18 Pépin M, Pardon P, Marly J, Lantier F. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *Am. J. Vet. Res.* 49, 459–463 (1988).
- 19 Pépin M, Fontaine JJ, Pardon P, Marly J, Parodi AL. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Vet. Microbiol.* 29, 123–134 (1991).
- 20 McKean S, Davies J, Moore R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microb. Infect.* 7, 1352–1363 (2005).
- 21 Hard GC. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 12, 1439–1449 (1975).
- 22 Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137, 179–210 (2007).
- **Comprehensive review of *C. pseudotuberculosis*, focusing on the pathogenesis and immunological aspects of infection in sheep.**
- 23 Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5, 156–161 (1997).
- 24 Cameron CM. The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Proc. Goat Prod. Dis.* 3, 458–468 (1982).
- 25 Brown CC, Olander HJ, Biberstein EL, Morse SM. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1116–1119 (1986).
- 26 Pépin M, Seow HF, Corner L, Rothel JS, Hodgson AL, Wood PR. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28, 149–163 (1997).
- 27 Jolly RD. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *NZ Vet. J.* 13, 141–147 (1965).
- 28 Pépin M, Pittet J-C, Olivier M, Gohint I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukocyte Biol.* 56, 666–670 (1994).
- 29 Kuria JKN, Mbuthia PG, Kang'ethe EK, Wahome RG. *Caseous lymphadenitis* in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res. Commun.* 25, 89–97 (2001).
- 30 Pépin M, Pardon P, Lantier F, Marly J, Leveux D, Lamand M. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol.* 26, 381–392 (1991).
- 31 Walker J, Jackson H, Brandon MR, Meeusen E. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin. Exp. Immunol.* 86, 13–18 (1991).
- 32 Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM *et al.* Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 1213–1217 (1988).
- 33 Garg DN, Chandiramani NK. Cellular and humoral immune response in sheep experimentally injected with killed and live *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A* 260, 117–125 (1985).
- 34 El-Enbaawy MI, Saad MM, Selim SA. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt. J. Immunol.* 12, 13–20 (2005).
- 35 Ellis JA, Hawk DA, Mills KW, Pratt DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 303–316 (1991).
- 36 Paule BJA, Azevedo V, Regis LF *et al.* Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 129–139 (2003).
- 37 Meyer R, Regis L, Vale V *et al.* *In vitro* IFN- $\gamma$  production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 249–254 (2005).
- **Suggests that research on antigens of *C. pseudotuberculosis* capable of inducing cellular immunity is an important step for the development of novel vaccines and diagnostic kits.**
- 38 Sunil V, Menzies PI, Shewen PE, Prescott JF. Performance of a whole blood interferon- $\gamma$  assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. *Vet. Microbiol.* 128, 288–297 (2008).

- 39 Simmons CP, Hodgson AL, Strugnell RA. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 65, 3048–3056 (1997).
- 40 Lan DT, Taniguchi S, Makino S, Shirahata T, Nakane A. Role of endogenous tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\gamma$  interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42, 863–870 (1998).
- 41 Lan DT, Makino S, Shirahata T, Yamada M, Nakane A. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\gamma$  interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 1203–1208 (1999).
- 42 Eckersall PD, Lawson FP, Bence L *et al.* Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet. Res.* 3, 35–40 (2007).
- 43 Nakane A, Numata A, Chen Y, Minagawa T. Endogenous  $\gamma$  interferon-independent host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in CD4<sup>+</sup> T cell- and asialo GM1<sup>+</sup> cell-depleted mice. *Infect. Immun.* 59, 3439–3445 (1991).
- 44 Denis M. Modulation of *Mycobacterium lepraemurium*: growth in murine macrophages: beneficial effect of tumor necrosis factor  $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Infect. Immun.* 59, 705–707 (1991).
- 45 Braithwaite CE, Smith EE, Songer JG, Reine AH. Characterization of detergent soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 38, 59–70 (1993).
- 46 Paule B, Azevedo V, Moura-Costa LF *et al.* SDS-PAGE and western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *R. Ci. Méd. Biol.* 3, 44–52 (2004).
- 47 McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43°C. *Res. Microbiol.* 158, 279–286 (2007).
- 48 Muckle CA, Menzies PI, Li Y, Hwang Y-T, van Wesenbeeck M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 30, 47–58 (1992).
- 49 Williamson LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17, 359–371 (2001).
- 50 Fontaine MC, Baird G, Connor KM *et al.* Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24, 5986–5996 (2006).
- 51 Menzies PI, Muckle CA, Hwang Y-T, Songer JG. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin. Res.* 13, 193–198 (1994).
- 52 Hodgson ALM, Carter K, Tachedjian M *et al.* Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 17, 802–808 (1999).
- 53 Brogden KA, Chedid L, Cutlip RC, Lehmkühl HD, Sacks J. Effect of MDP on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *Am. J. Vet. Res.* 51, 200–202 (1990).
- 54 Walker J, Jackson HJ, Eggleton DG, Meeusen ENT, Wilson MJ, Brandon MR. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.* 62, 2562–2567, (1994).
- 55 Prescott JF, Menzies PI, Hwang Y-T. An interferon- $\gamma$  assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiol.* 88, 287–297 (2002).
- 56 Binns SH, Green LE, Bailey M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 123, 169–179 (2007).
- 57 Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T *et al.* A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 75, 167–175 (2000).
- 58 Carminatti R, Bahia R, Moura-Costa LF *et al.* Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.* 2, 88–93 (2003).
- 59 ter Laak EA, Bosch J, Bijl GC, Schreuder BE. Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1125–1132 (1992).
- 60 Day MJ. Vaccine side effects: fact and fiction. *Vet. Microbiol.* 117, 51–58 (2006).
- 61 Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub GC, Audibert F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 62, 38–43 (1998).
- 62 Eggleton DG, Middleton HD, Doidge CV, Minty DW. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.* 68, 317–319 (1991).
- 63 Piontkowski MD, Shivvers DW. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1765–1768 (1998).
- 64 Paton MW, Sutherland SS, Rose IR, Hart RA, Mercy AR, Ellis TM. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Aust. Vet. J.* 7, 266–269 (1995).
- 65 Ribeiro OC, Silva JAH, Oliveira SC, Meyer R, Fernandes GB. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. *Pesq. Agropec. Bras.* 26, 461–465 (1991).
- 66 Hodgson ALM, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62, 5275–5280 (1994).
- 67 Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, Hodgson ALM, Strugnell RA. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66, 474–479 (1998).
- 68 Braga WU. Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet. Microbiol.* 119, 297–303 (2007).
- 69 Tachedjian M, Krywult J, Moore RJ, Hodgson ALM. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* 13, 1785–1792 (1995).
- 70 Moore RJ, Rothel L, Krywult J, Radford AJ, Lund KL, Hodgson ALM. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* 18, 487–497 (2000).
- 71 Chaplin PJ, de Rose R, Boyle JS *et al.* Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 67, 6434–6438 (1999).

- 72 De Rose R, Tennent J, McWaters P *et al.* Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 55–63 (2002).
- **Comparison of the immune responses elicited by different routes of DNA immunization against CLA.**
- 73 Wilson MJ, Brandon MR, Walker J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 206–211 (1995).
- 74 Pépin M, Pardon P, Marly J, Lantier F, Arrigo JL. Acquired immunity after primary caseous lymphadenitis in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 54, 873–877 (1993).
- 75 Hodgson AL, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.* 60, 2900–2905 (1992).
- 76 Moore RJ, Stewart DJ, Lund K, Hodgson AL. Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic protease antigen. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 193–196 (2001).
- 77 Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R *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.* 126, 131–141 (2008).
- 78 Paule BJA, Meyer R, Moura-Costa LF *et al.* Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 34, 311–316 (2004).
- 79 Babiuk LA. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* 17, 1587–1595 (1999).
- 80 Ellis RW. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine* 19, 2681–2687 (2001).
- 81 Pacheco LG, Pena RR, Castro TL *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.* 56, 480–486 (2007).
- 82 Ellis JA, Hawk DA, Mills KW, Pratt DL. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 289–301 (1991).
- 83 Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85, 153–166 (2003).
- 84 Delbridge LM, O’Riordan MXD. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 10–16 (2007).
- 85 Jo EK. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 279–286 (2008).
- 86 Majlessi L, Combaluzier B, Albrecht I *et al.* Inhibition of phagosome maturation by mycobacteria does not interfere with presentation of mycobacterial antigens by MHC molecules. *J. Immunol.* 179, 1825–1833 (2007).
- 87 Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 41–45 (2002).

### Websites

- 101 Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola SA [www.seagri.ba.gov.br/ebda/abril-maio00mat-7.htm](http://www.seagri.ba.gov.br/ebda/abril-maio00mat-7.htm)
- 102 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Caprinos) [www.cnpc.embrapa.br](http://www.cnpc.embrapa.br)
- 103 Minas Gerais Genome Network <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br>

### Affiliations

- Fernanda Alves Dorella, MSc Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486 CEP: 31 270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil Tel.: +55 313 409 2610 Fax: +55 313 409 2610 [dorella@icb.ufmg.br](mailto:dorella@icb.ufmg.br)
- Luis Gustavo Carvalho Pacheco, MSc Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486 CEP: 31 270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil Tel.: +55 313 409 2610 Fax: +55 313 409 2610 [lpacheco@icb.ufmg.br](mailto:lpacheco@icb.ufmg.br)
- Núbia Seyffert, MSc Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486 CEP: 31 270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil Tel.: +55 313 409 2610 Fax: +55 313 409 2610 [seyffert@ufmg.br](mailto:seyffert@ufmg.br)
- Ricardo Wagner Portela, PhD Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, CEP 40 110-100, Brazil Tel.: +55 713 332 3341 Fax: +55 713 235 9682 [rwportela@uol.com.br](mailto:rwportela@uol.com.br)
- Roberto Meyer, PhD Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, CEP 40 110-100, Brazil Tel.: +55 713 332 3341 Fax: +55 713 235 9682 [rmeyer@ufba.br](mailto:rmeyer@ufba.br)
- Anderson Miyoshi, PhD Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486 CEP: 31 270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil Tel.: +55 313 409 2610 Fax: +55 313 409 2610 [miyoshi@icb.ufmg.br](mailto:miyoshi@icb.ufmg.br)
- Vasco Azevedo, PhD Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486 CEP: 31 270-901, Belo Horizonte – MG, Brazil Tel.: +55 313 409 2610 Fax: +55 313 409 2610 [vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br)

# SEÇÃO II

## 1. Qualificação do principal problema

O rebanho mundial de caprinos e ovinos é de aproximadamente 900 milhões de cabeças. O Brasil possui cerca de 23 milhões, sendo 37% (8.510.000 cabeças) de caprinos e 63% (14.490.000 cabeças) de ovinos. Dos caprinos, 1,4% encontram-se na Região Norte, 93% no Nordeste, 2,4% no Sudeste, 1,9% no Sul e 1% no Centro-Oeste. Com relação ao rebanho ovino, 2,8% encontram-se na Região Norte, 49% no Nordeste, 2,8% no Sudeste, 4% no Sul e 4,9% no Centro-Oeste (IBGE, 2008). A exportação de peles ovinas acumulada no período de 1992 a 1999 foi de US\$ 87,1 milhões e no período de 2000 foi de US\$ 7,1 milhões. Já a exportação de peles caprinas acumulada no período de 1992 a 1999 representou um total de US\$ 25,9 milhões e entre 2000 e 2002 representou cerca de US\$ 30 milhões (IBGE, 2008).

No Brasil, estimativas demonstram que a maior parte dos animais esteja infectada por *C. pseudotuberculosis* e que a prevalência clínica da LC esteja em torno de 30% (Ribeiro *et al.*, 2001). Os estados da Região Nordeste são considerados os mais afetados, porém em Minas Gerais (Região Sudeste), mesmo possuindo um rebanho ainda reduzido, 84,3% dos produtores relataram ter problemas em consequência da patologia (Faria *et al.*, 2004; Guimarães, 2006). Estudos recentes realizados por nosso grupo em aproximadamente 200 propriedades do estado de Minas Gerais demonstraram soroprevalência da LC de 70% em ovinos e 80% em caprinos (Seyffert *et al.*, manuscrito submetido). Para a caprino e ovinocultura no país, trata-se de um sério problema, pois são atividades rurais de grande importância para pequenos e médios produtores e constituem as principais fontes econômicas e de nutrição dessa população. As perdas econômicas, acarretadas pela LC, podem ser evidenciadas através da diminuição da produção de leite e da desvalorização da carne e da pele devido às cicatrizes (<http://www.snagricultura.org.br>).

Com a crescente procura por produtos e subprodutos da ovinocaprinocultura, há um número maior de empresários dispostos a investir nessas atividades, o que resulta em uma busca maior por tecnificação nas duas culturas, e por medidas de saúde preventivas mais eficazes e de pronto acesso. Neste sentido, a inexistência de um método de diagnóstico satisfatório para LC, principalmente na fase subclínica da enfermidade, conjugada à falta de uma vacina contra *C. pseudotuberculosis*, realmente eficaz na redução da incidência da doença são dois dos principais problemas a serem superados na pecuária de pequenos ruminantes no país.

## 2. Justificativa

Como mencionado anteriormente, o *status* da LC no Brasil tornou-se preocupante, uma vez que a caprino e ovinocultura no Brasil vêm tomando grandes dimensões com o aumento do interesse popular por seus produtos e derivados, como carne, lã, couro, leite, queijo etc. Sendo assim, enormes esforços vêm sendo feitos para erradicar a LC dos rebanhos. Visto que o tratamento dos indivíduos infectados não é economicamente viável e as vacinas disponíveis não oferecem a proteção necessária contra a infecção ou não foram ainda suficientemente testadas em campo, o desenvolvimento de uma vacina realmente eficaz é fundamental.

### 2.1. Propostas para a solução do problema apresentado

Diversas estratégias vêm sendo testadas com o intuito de se obter uma vacina protetora contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*, como o uso de bactérias vivas atenuadas, bactérias inativadas, lipídios tóxicos da parede bacteriana, antígenos secretados contidos no sobrenadante da cultura bacteriana, combinações de componentes celulares e do sobrenadante da cultura, proteínas recombinantes e vacinas de DNA (LeaMaster *et al.*, 1987; Holstad, 1989; Brogden *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1991; Eggleton *et al.*, 1991; Chaplin *et al.*, 1999). Todas essas preparações apresentaram certo grau de proteção contra infecções experimentais ou naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões foram variáveis.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando nas mais diversas áreas relacionadas ao agente da LC visando aumentar o conhecimento existente sobre os mecanismos de patogenicidade e virulência desta bactéria e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias, vacinais e testes diagnósticos, para a erradicação da doença. Para tanto, o LGCM em 2003 iniciou um programa de identificação de novos genes de *C. pseudotuberculosis*. Em uma de suas vertentes, este programa teve como objetivo identificar genes cujos produtos codificados fossem exportados (ancorados à membrana e/ou secretados). O interesse por esse subgrupo de produtos exportados foi devido ao fato destes produtos gênicos constituírem a principal classe de fatores de virulência bacterianos. Estes incluem fatores de adesão e colonização (fimbrias/pili), invasinas, exotoxinas, sistemas de transporte e sideróforos, os quais são considerados potenciais candidatos no desenvolvimento de vacinas e alvos para terapia de drogas.

Os dois capítulos a seguir descrevem o processo de obtenção de mutantes de *C. pseudotuberculosis* através da utilização de um sistema de transposição *in vivo* baseado no TnFuZ (Dorella *et al.*, 2006b e 2006c). Neste trabalho foram identificados 21 diferentes

mutantes cujos loci gênicos interrompidos pela inserção do transposon poderiam ter relação direta com a virulência de *C. pseudotuberculosis*. A identificação e caracterização destes produtos gênicos poderiam contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelos microrganismos patogênicos para interagir, sobreviver e causar danos ao hospedeiro. Sendo assim, propomos, como uma primeira estratégia para superar o problema apresentado, a utilização destas linhagens recombinantes como vacinas vivas atenuadas no combate à LC.

Além desta estratégia, propomos, também, testar a capacidade de linhagens selvagens inativadas conferirem proteção aos animais imunizados contra a infecção. Essa segunda estratégia é justificada pelo interesse de empresas de produtos veterinários, como a nossa colaboradora Vallée S.A., por uma alternativa vacinal contra a doença.

**Capítulo I** – An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 114: 298–303 (2006).

No decorrer dos trabalhos de obtenção de mutantes de *C. pseudotuberculosis* em nosso laboratório, nós nos deparamos com o fato de não conseguirmos alcançar uma eficiência de transformação suficiente para nossos objetivos. Isso porque os dados disponíveis na literatura não nos permitiam obter resultados totalmente satisfatórios (Songer *et al.*, 1991; van der Rest *et al.*, 1999; Tauch *et al.*, 2002). Tendo em vista nossa busca por um processo de transformação mais eficiente e adequado de *C. pseudotuberculosis* partimos para o estabelecimento de um protocolo que atendesse às nossas necessidades.

Nosso protocolo foi obtido através da otimização de diversos parâmetros como: fase de crescimento da bactéria, suplementação do meio de cultura, quantidade e qualidade do DNA a ser transformado, entre outros. Com este trabalho alcançamos uma eficiência de  $10^5$  UFC por  $\mu\text{g}$  de DNA utilizado, cerca de 10 vezes mais eficiente que os anteriormente publicados e, além disso, diferentemente destes, aplicável a diversas linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

O trabalho apresentado a seguir neste manuscrito foi publicado durante o segundo ano do Doutorado.





## An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

F.A. Dorella<sup>a</sup>, E.M. Estevam<sup>a</sup>, P.G. Cardoso<sup>b</sup>, B.M. Savassi<sup>a</sup>,  
S.C. Oliveira<sup>b</sup>, V. Azevedo<sup>a,1</sup>, A. Miyoshi<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received 31 January 2005; received in revised form 9 December 2005; accepted 13 December 2005

### Abstract

We developed an improved protocol for the electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, testing variations of parameters in the procedures that are routinely used for the preparation of electrocompetent cells of this species, including (i) culture conditions, (ii) cell growth phase, (iii) electroporation solutions and (iv) quantity of plasmid DNA. We obtained the greatest efficiency of transformation when the cells were grown until the stationary phase and then washed with 10% glycerol electroporation solution. The transformation efficiency was inversely proportional to the quantity of plasmid DNA. The transformation efficiency reached  $10^5$  colony-forming units (cfu)/ $\mu\text{g}$  plasmid DNA. This protocol would be useful for genetic studies of *C. pseudotuberculosis*.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Plasmid transformation; Electroporation

### 1. Introduction

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive intracellular pathogen that causes a chronic disease condition in sheep and goats, known as caseous

lymphadenitis (CLA). This bacterium is distributed worldwide, but it has a higher prevalence in certain regions, namely Australia, New Zealand, South Africa, the United States of America and Brazil (Merchant and Packer, 1967; Buxton and Fraser, 1977). CLA is characterized by the formation of necrotic lesions, typically located in superficial lymph nodes and in the lungs. Economic losses due to CLA are caused by reduced wool and meat production and increased culling and condemnation of carcasses and skins in slaughterhouses (Ayers, 1977).

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34 99 26 10;  
fax: +55 31 34 99 26 10.

E-mail address: [miyoshi@icb.ufmg.br](mailto:miyoshi@icb.ufmg.br) (A. Miyoshi).

<sup>1</sup> These authors share credit in this work for senior authorship.

There is not much information concerning the molecular mechanisms of virulence and pathogenicity of this bacterium (Coyle and Lipsky, 1990); efficient methods for the genetic manipulation of *C. pseudotuberculosis*, such as transformation protocols, would be useful. To date, there has been only one report of electrotransformation of *C. pseudotuberculosis*; there was a maximum transformation efficiency of  $10^4$  colony-forming units (cfu)/ $\mu\text{g}$  of plasmid DNA (Songer et al., 1991). Laborious methods, including a two-step transformation procedure, medium supplementation, protoplast transformation and high-intensity electric fields, have been used for the transformation of *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* and other species of Corynebacteria. However, these complex and time-consuming methods are difficult to reproduce, and the protocols are usually limited to one particular bacterial strain (Katsumata et al., 1984; Serwold-Davis et al., 1987; Liebl et al., 1989; Bonamy et al., 1990; Songer et al., 1991; van der Rest et al., 1999; Jang and Britz, 2000; Tauch et al., 2002). In order to overcome these difficulties, we developed an improved protocol for the electrotransformation of five different strains of *C. pseudotuberculosis*, which was achieved by systematic analysis of previously established parameters used for the transformation of Corynebacteria.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains, growth conditions and plasmid

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain containing the pEC-K18mob2 plasmid (Table 1) was aerobically grown in Luria-Bertani medium (LB, Difco Laboratories,

Detroit, USA) at 37 °C. The *C. pseudotuberculosis* strains were aerobically grown in Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia Manufacturers, Inc., Baltimore, MD, USA) medium at 37 °C, supplemented or not with glycine (1.5%, v/v). Plasmid-containing transformants were selected by the addition of kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for *E. coli* and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for *C. pseudotuberculosis*).

### 2.2. DNA manipulation and bacterial transformation

pEC-K18mob2 was extracted from *E. coli* by the alkaline lysis procedure (Birnboim and Doly, 1979). Plasmid DNA quantification was performed by spectrophotometry (UV mini 1240 UV–vis Spectrophotometer, Shimadzu), as previously described (Sambrook et al., 1989).

Electrocompetent cells were prepared as follows (the following improved protocol corresponds to three different assays with similar results, Table 2): a single colony of *C. pseudotuberculosis* was grown overnight, diluted in fresh medium (1:50) and then incubated for 72 h to an optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ ) = 1.0–1.5. In some trials, 1.5% glycine (v/v) was added to the culture at  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  = 0.5, with growth till  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  = 1.0–1.5. Cells were then harvested by centrifugation at 5000 rpm at 4 °C for 20 min. The cell pellets were washed four times with 40 ml of ice-cold 10% glycerol in water (v/v). Following the last centrifugation, the cells were resuspended in 1 ml 10% glycerol. Aliquots (100  $\mu\text{l}$ ) were frozen in dry ice and methanol and were stored at –70 °C.

Electroporation assays were performed as follows: one aliquot of electrocompetent cells was thawed on ice for 5 min, and plasmid DNA was added. The mixture was then transferred to an electroporation

Table 1  
Bacterial strains and plasmid used for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Bacterium/plasmid	Strain	Description	Source/reference
<i>C. pseudotuberculosis</i>	T1	Wild strain, isolated from goats	Dr. Roberto Meyer Universidade Federal da Bahia
<i>C. pseudotuberculosis</i>	T2	Wild strain, isolated from goats	Dr. Roberto Meyer
<i>C. pseudotuberculosis</i>	1002	Attenuated strain, isolated from goats	Dr. Roberto Meyer
<i>C. pseudotuberculosis</i> subsp. <i>ovis</i>	CIP 102968T	Wild strain, isolated from sheep	Dr. Mario Vaneechoutte University Hospital, Ghent Belgium
<i>C. pseudotuberculosis</i> pEC-K18mob2	HJ ULCC06.334.4	Wild strain, isolated from goats Corynebacteria replicative-vector	Dr. Mario Vaneechoutte Tauch et al. (2002)

Table 2  
Outline of the electroporation parameters that gave the best results for *Corynebacterium pseudotuberculosis* transformation

Parameter	Optimal condition
Culture density	Stationary phase (1.0–1.5 OD at 600 nm)
Medium supplementation	Strain-dependent
Electroporation solution	10% ice-cold glycerol
DNA concentration	Less than 100 ng
Heat shock	Strain-dependent

cuvette (interelectrode distance: 0.2 cm); the samples were electroporated by using the Gene Pulser System<sup>TM</sup> (Bio-Rad, CA, USA), with the parameters: (i) 2.5 kV (equivalent to 12.5 kV/cm); (ii) 200  $\Omega$  and (iii) 25  $\mu$ F (van der Rest et al., 1999). Immediately after the electric pulse, 1.5 ml of Brain Heart Infusion (BHI) medium was added to the cell culture, which was then incubated for 2 h at 37 °C, without agitation. In some trials, the cells were exposed to heat shock at 46 °C in a water bath during 6 min, after electroporation. Finally, aliquots of cell suspensions were plated on selective BHI agar plates and were incubated at 37 °C for 48 h to recover transformants.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of growth conditions

We analyzed several parameters to determine the optimal growth conditions to prepare electrocompetent *C. pseudotuberculosis* cells, including media supplementation (with or without glycine) and growth phase [(OD<sub>600 nm</sub>) = 0.5 (exponential-phase) or = 1.5 (stationary-phase)], before the washing steps.

Efficient transformation of *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* and other Gram-positive bacteria depends on glycine supplementation (Dunny et al., 1991; Serwold-Davis et al., 1987; Kalscheuer et al., 1999; van der Rest et al., 1999; Jang and Britz, 2000; Lee et al., 2002; Tauch et al., 2002). Glycine is thought to inhibit the cross-linking of the peptidoglycan layer (Hammes et al., 1973; Akhtar et al., 2000). However, Serror et al. (2002) found that glycine did not improve *Lactobacillus delbrueckii* electrotransformation.

We examined whether glycine can improve the transformation efficiency of *C. pseudotuberculosis*

strains (Table 1). The cells were grown in BHI medium until OD<sub>600 nm</sub> = 0.5 was reached, and glycine was added to a final concentration of 1.5% (v/v). The bacterial culture was then incubated for a further 36 h or until OD<sub>600 nm</sub> = 1.0–1.5. Finally, electrocompetent cells were prepared as described in Section 2.

Some researchers have found that an efficient electrotransformation protocol also depends on the quantity and viability of the cells to be transformed (Bonamy et al., 1990; Songer et al., 1991; van der Rest et al., 1999; Tauch et al., 2002). We tested glycine medium supplementation in different culture growth phases (lag-, exponential- and stationary-phase, data not shown); and, surprisingly, cells grown in BHI until OD<sub>600 nm</sub> = 1.0–1.5 gave the highest number of viable cells, about 10<sup>10</sup> cells/ml per strain. Consequently, these growing conditions were adopted during all experiments.

We noted only a modest transformation efficiency improvement attributable to glycine in HJ ULCC06.334.4 strain, reaching 1.07  $\times$  10<sup>5</sup> transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA (Table 7). In the CIP 102968T strain, the glycine supplementation together with heat shock proved to be the best combination for electrotransformation, reaching 5.6  $\times$  10<sup>4</sup> transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA (Table 6). In the other strains, glycine had only a minor influence on transformation efficiency, even when large quantities of DNA were added (Tables 3–5).

#### 3.2. Electroporation solution

Various electroporation solutions have been used to wash electrocompetent cells of Gram-positive bacteria, such as: (i) 275 mM sucrose, 2.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7.4 (Songer et al., 1991), (ii) 7 mmol/l HEPES and 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> at pH 6.0 (O'Sullivan and Fitzgerald, 1999), (iii) 0.4 M sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 6.0 (Serror et al., 2002) and (iv) 1 mM Tris-HCl at pH 7.5 and 10% glycerol (v/v) (Tauch et al., 2002). Less complex solutions have also been used, including (i) ice-cold glycerol 10% (v/v) (van der Rest et al., 1999; Tauch et al., 2002) and (ii) warm glycerol plus sucrose (Lee et al., 2002), with similar results to ours.

When the cells were washed with ice-cold glycerol 10% (v/v), the transformation efficiency was 10<sup>5</sup> cfu/ $\mu$ g of plasmid DNA, which is similar to or higher than

Table 3

Effects of DNA concentration, glycine supplementation and heat shock on the transformation efficiency of the T1 strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DNA (ng)	Transformants/ $\mu$ g DNA			Gly + HS
	Gly	HS		
0	0	0	0	0
1	$1.5 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$7.8 \times 10^4$
10	$2.4 \times 10^4$	$5.8 \times 10^4$	$3.6 \times 10^3$	$6.5 \times 10^4$
100	$1.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	$2.4 \times 10^4$
500	$8.2 \times 10^3$	$4.9 \times 10^3$	$3.2 \times 10^2$	$7.05 \times 10^3$
1000	$1.2 \times 10^3$	$9.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^2$	$4.9 \times 10^3$

Gly, 1.5% glycine; HS, heat shock. All electroporation assays were carried out under the following basic conditions: cells cultivated in Brain Heart Infusion to an  $OD_{600\text{ nm}} = 1.0 - 1.5$ ; when necessary, 1.5% glycine was added at  $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$ ; ice-cold 10% (v/v) glycerol was used as an electroporation solution. The electroporation parameters were 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  and 2.5 kV (12.5 kV/cm). A heat shock of 46 °C in a water bath for 6 min was applied after electroporation.

that obtained with more complex solutions (Songer et al., 1991; O'Sullivan and Fitzgerald, 1999; Tauch et al., 2002; Serror et al., 2002). Consequently, we adopted ice-cold glycerol 10% (v/v) as the electroporation solution for our electrotransformation procedures. The pellet was washed four times with this solution in order to avoid arching during the electroporation assay.

### 3.3. Quantity of plasmid DNA

Large quantities of plasmid DNA are normally used in protocols for the transformation of *Corynebacteria* and other Gram-positive bacteria (Bonamy et al., 1990; Kurusu et al., 1990; Kalscheuer et al., 1999; van

Table 4

Effects of DNA concentration, glycine supplementation and heat shock on transformation efficiency in the T2 strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DNA (ng)	Transformants/ $\mu$ g DNA			Gly + HS
	Gly	HS		
0	0	0	0	0
1	$4.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$2.8 \times 10^4$
10	$1.8 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$	$8.0 \times 10^2$	$4.0 \times 10^3$
100	$3.53 \times 10^2$	$5.6 \times 10^2$	$2.13 \times 10^2$	$1.46 \times 10^2$
500	$3.45 \times 10^2$	$1.06 \times 10^2$	80	$5.84 \times 10^2$
1000	16	34	5	$3.08 \times 10^2$

See Table 3 for abbreviations and general electroporation assay conditions.

Table 5

Effects of DNA concentration, glycine supplementation and heat shock on transformation efficiency in strain 1002 of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DNA (ng)	Transformants/ $\mu$ g DNA			Gly + HS
	Gly	HS		
0	0	0	0	0
1	$2.54 \times 10^5$	$2.13 \times 10^4$	$1.64 \times 10^5$	$3.25 \times 10^4$
10	$8.09 \times 10^4$	$4.58 \times 10^4$	$2.48 \times 10^4$	$4.73 \times 10^3$
100	$4.8 \times 10^3$	$9.94 \times 10^3$	$1.2 \times 10^2$	$4.45 \times 10^4$
500	$6.56 \times 10^2$	$6.36 \times 10^3$	8	$3.65 \times 10^3$
1000	$5.64 \times 10^2$	$5.6 \times 10^3$	12	$1.88 \times 10^3$

See Table 3 for abbreviations and general electroporation assay conditions.

der Rest et al., 1999; Lee et al., 2002; Tauch et al., 2002). We used various quantities of plasmid DNA, ranging from 1 to 1000 ng, to determine the optimal concentration for *C. pseudotuberculosis* transformation in electroporation assays. Based on several studies (Bonamy et al., 1990; Kurusu et al., 1990; Kalscheuer et al., 1999; van der Rest et al., 1999; Lee et al., 2002; Tauch et al., 2002), we expected a linear relationship between plasmid DNA quantity and the number of transformants. However, different from these reports, we found that 100 ng of plasmid DNA was sufficient for high transformation efficiency.

The highest transformation efficiencies were obtained with 1 ng of plasmid DNA, for all the strains and under all conditions. Transformation efficiency was inversely proportional to the quantity of plasmid DNA in all strains (Tables 3–7), reaching  $10^4$ – $10^5$  transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA, as postulated by Songer et al. (1991). Glycine supplementation alone, as well as in combination with heat shock treatment, resulted in a modest increase in transformation efficiencies, mainly in the T2 (Table 4), 1002 (Table 5) and CIP 102968T (Table 6) strains. These results were only obtained with large quantities of DNA.

### 3.4. Host restriction-modification system

Transformation efficiency can be severely affected by heterologous plasmid DNA from other species of *Corynebacteria*, mainly *C. glutamicum*, due to host restriction-modification systems, which can almost completely degrade such DNA (Liebl et al., 1989; Bonamy et al., 1990; Schafer et al., 1994a,b; Ankri et al., 1996a,b; van der Rest et al., 1999; Jang and

Table 6

Effects of DNA concentration, glycine supplementation and heat shock on transformation efficiency in the CIP 102968T strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DNA (ng)		Transformants/ $\mu$ g DNA		Gly + HS
		Gly	HS	
0	0	0	0	0
1	$2.6 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	$8.0 \times 10^3$	$5.6 \times 10^4$
10	$2.0 \times 10^3$	$4.23 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$	$6.0 \times 10^3$
100	$6.1 \times 10^2$	$1.85 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$	$6.8 \times 10^2$
500	52	$1.28 \times 10^2$	16	62
1000	8	51	4	47

See Table 3 for abbreviations and general electroporation assay conditions.

Britz, 2000; Tauch et al., 2002). It is also known that cells exposed to stress conditions, such as heat, have reduced activity in such systems (Schafer et al., 1994a,b). Consequently, various protocols adopt a heat shock treatment, following electroporation, in order to reduce the activity of these restriction-modification systems, increasing the transformation efficiency of these bacteria (Schafer et al., 1994a,b; van der Rest et al., 1999; Tauch et al., 2002).

We tested whether heat shock would improve the transformation efficiency of *C. pseudotuberculosis* strains. Immediately after electroporation, we resuspended the cells in 1.5 ml of BHI medium and incubated them for 6 min in a water bath at 46 °C. The cell suspension was then incubated at 37 °C for 2 h without agitation. Finally, the cells were plated on selective BHI agar plates and incubated at 37 °C for 48 h to recover transformants.

We observed that heat shock treatment, by itself, did not drastically affect the transformation efficiency

Table 7

Effects of DNA concentration, glycine supplementation and heat shock on transformation efficiency in the HJ ULCC06.334.4 strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DNA (ng)		Transformants/ $\mu$ g DNA		Gly + HS
		Gly	HS	
0	0	0	0	0
1	$9 \times 10^4$	$1.07 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
10	$4.8 \times 10^3$	$9.2 \times 10^3$	$7.2 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$
100	$3.98 \times 10^3$	$3.8 \times 10^4$	$4.24 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$
500	$2.5 \times 10^3$	$1.31 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$
1000	$1.5 \times 10^3$	$6.4 \times 10^3$	$1.04 \times 10^2$	$1.7 \times 10^3$

See Table 3 for abbreviations and general electroporation assay conditions.

of *C. pseudotuberculosis* strains. The exception was the 1002 strain, which when submitted to heat shock treatment after electrotransformation, reached the same transformation efficiency as without heat shock ( $1.64 \times 10^5$  transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA, Table 5).

In contrast, the combination of heat shock with glycine supplementation improved the transformation efficiencies of T2 (Table 4) and CIP 102968T (Table 6). This combination (heat shock plus glycine) also gave the best electroporation conditions for the HJ ULCC06.334.4 strain, reaching  $2.8 \times 10^5$  transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA (Table 7).

Moreover, we observed that with large quantities of DNA (500 and 1000 ng), heat shock plus glycine allowed us to reach an approximately 10-fold greater transformation efficiency, compared to the other test conditions, mainly with the T2 strain (Table 4). This will be useful for studies of chromosomal integration with non-replicative plasmids, for which more than 500 ng of DNA is needed.

#### 4. Conclusions

We developed an improved protocol for the electrotransformation of *C. pseudotuberculosis*. Using this new protocol (Table 2), *C. pseudotuberculosis* electrotransformation was improved to  $10^5$  cfu/ $\mu$ g plasmid DNA, which is 10-fold more efficient than what has been previously reported for electrotransformation of this bacterium (Songer et al., 1991). Although this protocol has worked well for all the strains that we tested, some parameters may need to be adjusted for specific strains. Nevertheless, this improved transformation efficiency was reached with about 100–1000-fold less plasmid DNA than has been used for the transformation of both other Corynebacteria and other Gram-positive bacteria. This protocol will have considerable utility for genetic studies of *C. pseudotuberculosis*.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Andreas Tauch (University of Bielefeld, Germany) for providing the pEC-K18mob2 plasmid, Dr. Roberto Meyer (Universidade Federal da

Bahia, Brazil) for providing the *C. pseudotuberculosis* T1, T2 and 1002 strains and Dr. Mario Vaneechoutte (University Hospital, Ghent, Belgium) for providing the *C. pseudotuberculosis* CIP 102968T and HJ ULCC06.334.4 strains. This work was supported by CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil (FAPEMIG).

## References

- Akhtar, M.K., Kaderbhai, N., Kaderbhai, M.A., 2000. Growth of *Escherichia coli* on medium containing glycine increases transformation efficiency. *Anal. Biochem.* 277, 273–276.
- Ankri, S., Reyes, O., Leblon, G., 1996a. Electrotransformation of highly DNA-restrictive *Corynebacteria* with synthetic DNA. *Plasmid* 35, 62–66.
- Ankri, S., Reyes, O., Leblon, G., 1996b. Improved eletro-transformation of highly DNA-restrictive corynebacteria with DNA extracted from starved *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 247–251.
- Ayers, J.L., 1977. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1251–1254.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F., Leblon, G., 1990. Interspecies electro-transformation in *Corynebacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 263–270.
- Buxton, A., Fraser, G., 1977. *Corynebacterium*. In: Buxton, A., Fraser, G. (Eds.), *Animal Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, pp. 177–183.
- Coyle, M.B., Lipsky, B.A., 1990. *Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 227–246.
- Dunny, G.M., Lee, L.N., LeBlanc, D.J., 1991. Improved electro-poration and cloning vector system for Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1194–1201.
- Hammes, W., Schleifer, K.H., Kanler, O., 1973. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 116, 1029–1053.
- Jang, K.-H., Britz, M.L., 2000. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnol. Lett.* 22, 539–545.
- Kalscheuer, R., Arenskötter, M., Steinbüchel, A., 1999. Establishment of a gene transfer system for *Rhodococcus opacus* PD630 based on electroporation and its application for recombinant biosynthesis of poly (3-hydroxyalkanoic acids). *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 508–515.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T., Furuya, A., 1984. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 159, 306–311.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y., Yukawa, H., 1990. Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* 54, 443–447.
- Lee, S.-H., Cheung, M., Irani, V., Carroll, J.D., Inamine, J.M., Howe, W.R., Maslow, J.N., 2002. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis* 82, 167–174.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., Schleifer, K.H., 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 299–303.
- Merchant, I.A., Packer, R.A., 1967. The genus *Corynebacterium*. In: Merchant, I.A., Packer, R.A. (Eds.), *Veterinary Bacteriology and Virology*. The Iowa State University Press, IA, USA, pp. 425–440.
- O'Sullivan, T.F., Fitzgerald, G.F., 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 275–283.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schafer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., 1994a. Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 756–759.
- Schafer, A., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., 1994b. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 7309–7319.
- Serror, P., Sasaki, T., Ehrlich, D.S., Maguin, E., 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 46–52.
- Serwold-Davis, T.M., Groman, N., Rabin, M., 1987. Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4964–4968.
- Songer, J.G., Hilwig, R.W., Leeming, M.N., Iandolo, J.J., Libby, S.J., 1991. Transformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by eletroporation. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1258–1261.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A., Kalinowski, J., 2002. Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* 45, 362–367.
- van der Rest, M.E., Lange, C., Molenaar, D., 1999. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541–545.

**Capítulo II** – *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. Applied and Environmental Microbiology, 72: 7368–7372 (2006).

Com o intuito de adquirir informações a respeito dos mecanismos moleculares de virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, a utilização da técnica de mutagênese aleatória foi empregada visando à identificação de seqüências de DNA codificadoras de produtos exportados. Para tanto, utilizou-se o sistema de transposição *in vivo* baseado no TnFuZ (Gibson & Caparon, 2002). O TnFuZ é uma ferramenta genética usada para descoberta de proteínas exportadas por bactérias Gram-positivas. Baseia-se em um elemento transponível (Tn4001) combinado ao gene da fosfatase alcalina (*phoZ*) de *Enterococcus faecalis*, cujas regiões codificadoras do promotor e do peptídeo sinal foram removidas. Uma vez que a fosfatase alcalina está ativa somente quando secretada, a inserção deste transposon em loci gênicos que codificam proteínas exportadas leva a fusões que resultam em células secretando fosfatase e que são facilmente detectadas pela visualização *in vitro* do produto da degradação do substrato revelador 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (B.C.I.P.) por esta proteína.

Foi a primeira vez que um sistema de transposição foi empregado em *C. pseudotuberculosis* e utilizado para identificar genes codificadores de proteínas exportadas. Neste trabalho fomos capazes de identificar 34 mutantes dos quais 21 exibiam inserções em diferentes loci gênicos. Uma enorme variedade de proteínas, incluindo subunidades fimbriais, uma proteína relacionada à captação de ferro, adesinas, proteínas envolvidas em transporte, entre outras, puderam ser identificadas. Estas constituem, até o momento, a maior coleção de proteínas exportadas identificadas em corinebactérias através desta estratégia genética.

O trabalho apresentado, a seguir, neste capítulo foi publicado no segundo ano do Doutorado.

## In Vivo Insertional Mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an Efficient Means To Identify DNA Sequences Encoding Exported Proteins<sup>∇</sup>

Fernanda A. Dorella,<sup>1</sup> Estela M. Estevam,<sup>1</sup> Luis G. C. Pacheco,<sup>1</sup> Cláudia T. Guimarães,<sup>2</sup> Ubiraci G. P. Lana,<sup>2</sup> Eliane A. Gomes,<sup>2</sup> Michele M. Barsante,<sup>3</sup> Sérgio C. Oliveira,<sup>3</sup> Roberto Meyer,<sup>4</sup> Anderson Miyoshi,<sup>1†</sup> and Vasco Azevedo<sup>1\*†</sup>

Laboratório de Genética Celular e Molecular<sup>1</sup> and Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas,<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, and Núcleo de Biologia Aplicada, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Sete Lagoas,<sup>2</sup> Minas Gerais, and Instituto de Ciências da Saúde, Vale do Canela, Salvador, Bahia,<sup>4</sup> Brazil

Received 2 February 2006/Accepted 10 August 2006

**The reporter transposon-based system TnFuZ was used to identify exported proteins of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Thirty-four out of 1,500 mutants had detectable alkaline phosphatase (PhoZ) activity. This activity was from 21 *C. pseudotuberculosis* loci that code for fimbrial and transport subunits and for hypothetical and unknown-function proteins.**

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, a gram-positive, facultatively intracellular pathogen, is the main etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA), a common disease in sheep and goat populations throughout the world. CLA causes economic damage due to reduced wool and meat production, increased culling rates, and condemnations of carcasses and skins in abattoirs (5). Despite its importance for animal health, *C. pseudotuberculosis* is still poorly characterized, especially regarding genomic information. However, the genomes of several related species, such as *Corynebacterium diphtheriae* (2), *Corynebacterium glutamicum* (10), and *Corynebacterium efficiens* (16), have already been completely sequenced; this information will be helpful for better understanding of the biology of this microorganism.

We used a recently developed reporter transposon-based system, TnFuZ (8), to identify genes encoding exported proteins in *C. pseudotuberculosis*. This system combines a derivative version of the Tn4001 transposable element with the DNA fragment encoding the mature *Enterococcus faecalis* alkaline phosphatase gene (*phoZ*), whose product is active only when it is located outside the bacterial cytosol (8). Thirty-four out of 1,500 mutants had detectable PhoZ activity. We identified 21 loci coding for fimbrial and transport subunits, and also for hypothetical and unknown-function proteins, in *C. pseudotuberculosis*. These genes are potential targets for the development of new attenuated vaccine strains.

**In vivo insertional mutagenesis in *C. pseudotuberculosis* strain T1.** The *C. pseudotuberculosis* wild-type strain T1 was isolated from a caseous granuloma found in a CLA-affected goat in Bahia state (Brazil), identified by the API CORYNE

battery (Biomerieux, France). Electrocompetent *C. pseudotuberculosis* cells were prepared (4) and transformed with 1 µg of the nonreplicative TnFuZ-containing plasmid (pCMG8). Insertional mutants were isolated by plating on selective brain heart infusion agar plates (Oxoid Ltd., England) containing 25 µg/ml of kanamycin, supplemented with 40 µg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) (Sigma-Aldrich Co.), a substrate that allows recovery of *C. pseudotuberculosis* insertional mutant colonies with positive alkaline phosphatase activity (PhoZ<sup>+</sup>). We obtained 1,500 kanamycin-resistant *C. pseudotuberculosis* mutants, of which 34 (2.26%) exhibited the PhoZ<sup>+</sup> phenotype.

**Molecular characterization.** After insertional mutagenesis, chromosomal DNA from the 34 selected PhoZ<sup>+</sup> mutants was extracted by the 10% lysozyme and phenol-chloroform methods (18) and then directly sequenced using the Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing kit in an ABI 3100 automated DNA sequencer system (Applied Biosystems). The sequencing primer was EnPhoR1 (5'-TGC CTT CGC TTC AGC AAC CTC TGT TTG-3') (8), and the following PCR protocol was used: 4 min at 95°C and 100 cycles of 30 s at 95°C, 20 s at 50°C, and 4 min at 60°C. Sequences (approximately 200 bp) of interrupted *C. pseudotuberculosis* T1 genes from all 34 mutants were determined.

Nucleotide sequence similarity searches were performed with the BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) service at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The nucleotide sequences were analyzed by searching DNA and protein databases for similarity with sequences of *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, and *C. glutamicum* deposited in GenBank. Predicted amino-acid sequences were obtained by using the "Six Frame Translation Tool" service of the BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>). Further analyses for the identification of exporting motifs were performed with the following bioinformatics programs: Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/#submission>), and PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>).

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone and fax: 55 31 34 99 26 10. E-mail: [vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br).

† V.A. and A.M. share credit for senior authorship of this work.

∇ Published ahead of print on 1 September 2006.



TABLE 1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* DNA-PhoZ fusions

Strain	Function (organism)	Similar protein(s)	% aa <sup>a</sup> identity (% positive)	Transposon insertion site <sup>b</sup>	Phenotype	Identified export signals <sup>c</sup>
<b>Exported proteins</b>						
CZ171049	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	56 (68)	231/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (13)
CZ171052	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	56 (67)	166/490	Early-blue	SP (28–29) and TM (18)
CZ171054	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	50 (60)	147/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (10)
CZ171057	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	56 (67)	162/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (14)
CZ171058	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	70 (86)	193/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (5)
CZ171059	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	47 (62)	281/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (3)
CZ171060	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	64 (78)	198/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (15)
CZ171061	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	60 (74)	318/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (17)
CZ171064	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	59 (71)	231/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (13)
CZ171071	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	43 (56)	162/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (14)
CZ171072	Putative fimbrial subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938626	66 (83)	96/490	Early-blue	SP(28–29) and TM (10)
CZ171053	Putative iron transport system binding (secreted) protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938958	74 (84)	167/298	Early-blue	SP(39–40) and TM (12)
<b>Unknown-function proteins</b>						
CZ171068	Unknown				Early-blue	SP(29–30) and TM (4)
CZ171069	Unknown				Early-blue	SP(31–32) and TM (4)
<b>Membrane proteins</b>						
CZ171047	Putative membrane protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938972	52 (60)	94/377	Early-blue	SP(32–33) and TM (16)
CZ171050	Putative membrane protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938972	53 (61)	94/377	Early-blue	SP(32–33) and TM (16)
CZ171062	Putative membrane protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938972	52 (60)	94/377	Early-blue	SP(32–33) and TM (16)
CZ171074	Putative membrane protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 939774	28 (47)	202/321	Early-blue	TM (13)
<b>Cytoplasmic proteins</b>						
CZ171066	L-Serine dehydratase 1 ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938869	78 (84)	457/458	Late-blue	ND
CZ171067	L-Serine dehydratase 1 ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938869	39 (53)	457/458	Late-blue	ND
CZ171041	Cystathionine $\gamma$ -synthase ( <i>C. glutamicum</i> )	NP 601979	48 (62)	205/382	Early-blue	TM (12)
CZ171042	Hypothetical protein CEO202 ( <i>C. efficiens</i> )	NP 736812	70 (85)	263/275	Early-blue	TM (13)
CZ171043	Putative Sdr family-related adhesin ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 940409	44 (63)	949/951	Late-blue	SP(41–42) and TM (13)
CZ171044	Putative sodium:solute symporter ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 939374	84 (89)	400/552	Early-blue	TM (17)
CZ171045	Putative two-component system sensor kinase ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 938973	68 (82)	398/403	Early-blue	TM (15)
CZ171046	Hypothetical protein NCg12271 ( <i>C. glutamicum</i> )	NP 601554	36 (66)	87/341	Early-blue	SP(29–30) and TM (14)
CZ171063	Hypothetical membrane protein ( <i>C. glutamicum</i> )	NP 600387	42 (61)	78/157	Early-blue	SP(63–64) and TM (18)
CZ171070	Glycogen operon protein ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 939914	41 (62)	579/735	Late -blue	TM (5)
CZ171073	Putative proline-betaine transporter ( <i>C. glutamicum</i> )	NP 602258	30 (44)	388/504	Early-blue	TM (14)
CZ171048	Leucyl-tRNA synthetase ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 940621	88 (93)	148/960	Late -blue	ND
CZ171051	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase ( <i>C. efficiens</i> )	NP 738245	75 (84)	89/91	Late-blue	ND
CZ171055	Aspartate ammonia lyase ( <i>C. efficiens</i> )	NP 738243	68 (79)	359/538	Late-blue	ND
CZ171056	Putative methylmalonyl coenzyme A mutase small subunit ( <i>C. diphtheriae</i> )	NP 939625	81 (84)	603/603	Late -blue	ND
CZ171065	Putative uroporphyrin III C-methyltransferase CysG ( <i>C. efficiens</i> )	NP 737060	33 (48)	648/673	Late-blue	ND

<sup>a</sup> aa, amino acid.

<sup>b</sup> Presented as the last amino acid of the open reading frame product before the transposon/total number of amino acids in the open reading frame product, corresponding to a similar protein in *C. glutamicum*, *C. efficiens*, or *C. diphtheriae*, according to the database.

<sup>c</sup> SP, signal peptide; TM, transmembrane domain; ND, not detected. The number of transmembrane domains found and the cleavage sites of the signal peptide (amino acids) are given in parentheses.

Analyses of regions flanking the transposon insertion sites indicated similarity to 21 different loci, most of them encoding putative membrane proteins, such as fimbrial subunits and transport systems (Table 1). *C. pseudotuberculosis* DNA sequences encod-

ing hypothetical and unknown-function proteins were also identified (Table 1).

In our analysis, 14 *C. pseudotuberculosis* mutants presented insertions in genes encoding cell envelope-associated

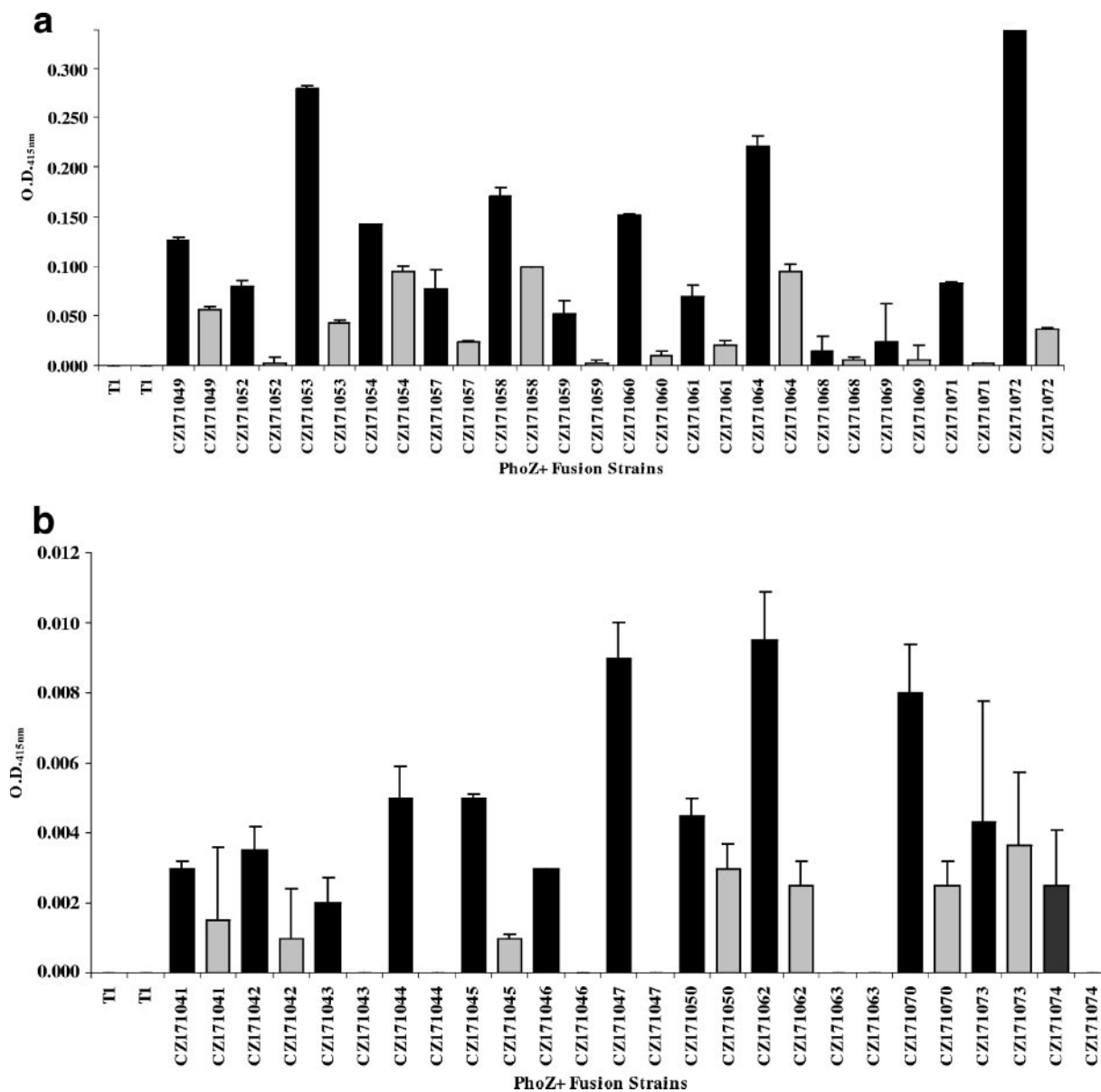


FIG. 1. Quantitative alkaline phosphatase activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* TnFuZ mutants. Alkaline phosphatase activity was measured in filtered and unfiltered culture supernatants, as described in Material and Methods. Shown are results for mutants harboring insertions in gene sequences that encode products homologous to exported proteins (a), membrane proteins (b), or cytoplasmic proteins (c). Values are means of three independent experiments for which the supernatants were collected from the exponential-growth phase. T1, negative-control strain.

proteins, 11 of which had insertions in different positions of the same locus of a putative fimbrial subunit found in *C. diphtheriae* NCTC13129 (2). This putative protein is a surface protein similar to the *Actinomyces viscosus* type 1 fimbrial major subunit precursor FimP. It is involved in bacterial binding to teeth through immobilized salivary statherin and acidic proline-rich protein; consequently, it participates in early plaque development and human mouth colonization (11). Fimbria and pilus proteins are particularly interesting, since fimbria-mediated adhesion is one of the best-studied strategies for host surface colonization by pathogenic microorganisms (6, 7, 13). Normally, these proteins play an important role in early steps of infection, since they are involved with pathogen-host adhesion.

Bacterial adherence to host cells or surfaces is often an essential first stage in disease, because it places pathogens at appropriate target tissues. Adhesion to host cells may lead to internalization, either by phagocytosis or by bacterium-induced endocytosis (6, 7).

The DNA flanking the insertion from mutant CZ171053 encodes a putative-iron transport system binding (secreted) protein similar to that from *C. diphtheriae* NCTC13129 (2). This protein is similar to *Escherichia coli* FecB, which belongs to the bacterial solute-binding protein family and is involved in the transport of iron from ferric citrate (20). Proteins related to iron transport are utilized by many bacterial pathogens to perceive iron-limiting conditions of the host and as an envi-

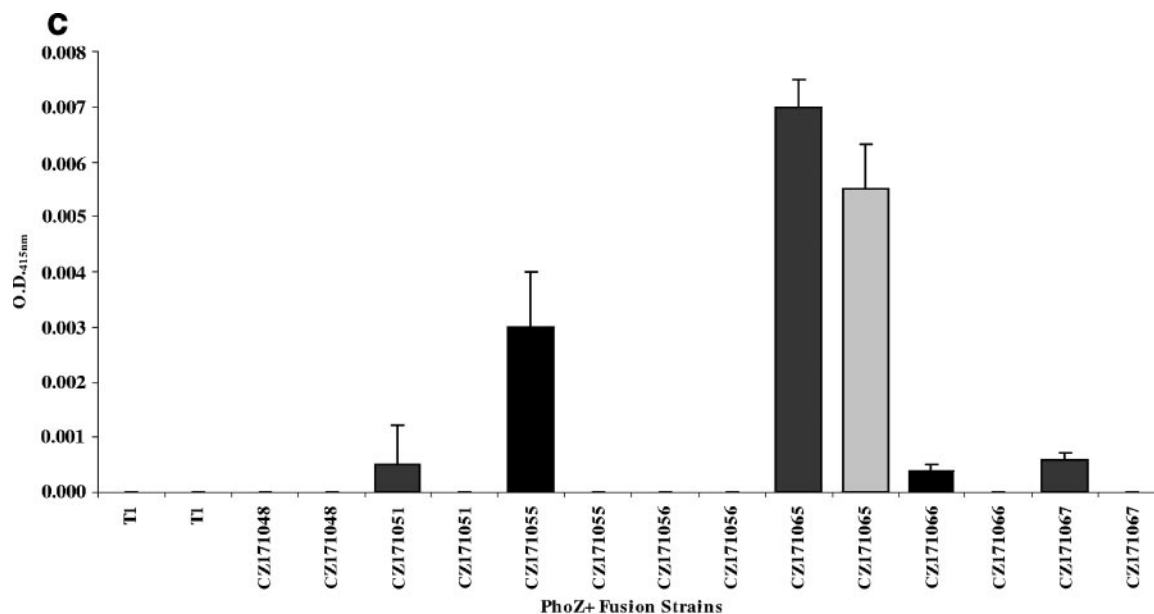


FIG. 1—Continued.

ronmental signal to induce expression of virulence factors (12, 17, 19). Moreover, iron modulates the adhesion of *C. diphtheriae* to cells of the human respiratory tract (15). In 2002, Billington et al. identified four genes in *C. pseudotuberculosis* involved in iron acquisition in mammalian hosts and concluded that this mechanism enhanced the capacity of this bacterium to develop a persistent infection in goats (1).

Two unknown genes were identified in the mutants CZ171068 and CZ171069. Although we obtained good-quality DNA sequences, ranging from 150 to 200 nucleotides, analyses of the DNA and amino acid sequences did not reveal any similarity with known sequences in databases. Searches for conserved protein motifs revealed probable cleavage sites in both of the deduced amino acid sequences (between amino acids 29 and 30 for CZ171068 and between amino acids 31 and 32 for CZ171069) of these proteins, indicating a hypothetical signal peptide; these will be investigated further.

The gene identified in mutant CZ171046 is similar to hypothetical protein NCgl2271 from *C. glutamicum* ATCC 13032 (10), which possesses a conserved cutinase domain (Pfam 01083; cutinase). Cutinase is a serine esterase, normally secreted by plant-pathogenic fungi, and it plays an important role in pathogenesis. It hydrolyzes plant cutin, thus facilitating fungus penetration (21, 22). Two cutinase-like proteins have also been found in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* (3). Three mutants of this species (CZ171047, CZ171050, and CZ171062) have insertions in the same locus, a gene similar to that of a putative membrane protein of *C. diphtheriae* NCTC13129 (2); they have a conserved PspC (Pfam 04024; COG 1983). Proteins harboring this motif are associated with the cell envelope, functioning as a stress-responsive element (14).

**Phenotypic characterization by the alkaline phosphatase activity assay.** During the isolation and screening of *C. pseudotuberculosis* T1 insertional mutant colonies for the PhoZ<sup>+</sup> phe-

notype, we observed two types of colonies: (i) “early-blue” colonies (25 out of 34 mutants), detected after 2 days of incubation, and (ii) “late-blue” colonies (9 out of 34 mutants), exhibiting a PhoZ<sup>+</sup> phenotype after 3 to 4 days. The phenotypes were confirmed by streaking the colonies onto fresh plates.

We used the alkaline phosphatase assay (9) to monitor the activity level of alkaline phosphatase in filtered (pore size, 0.22  $\mu$ m; Minisart; Sartorius Ltd., Epsom, United Kingdom) and unfiltered supernatants prepared from mid-log- to stationary-growth-phase bacterial cultures (optical density at 600 nm, 1.0 to 1.5). This approach was used to eliminate a possible background that could be generated by contamination with the remaining portions of the cells; it enabled differentiation between fusion proteins that were actually exported and those that normally remain in the cytoplasm. The alkaline phosphatase activities of *C. pseudotuberculosis* TnFuZ mutants were grouped into three categories, according to the proteins encoded by transposon-interrupted genes. (i) The first category consists of mutants harboring insertions in gene sequences that encode products homologous to exported proteins (Fig. 1a). As expected, this group had the highest levels of phosphatase alkaline activity, even after filtration. Although not all were secreted fusion proteins, we believe that the fimbrial subunit, for example, has weak interactions with the cell membrane and that this membrane is easily breached, making the fimbrial subunit detectable in the supernatant. (ii) The second category consists of mutants harboring insertions in gene sequences that encode products homologous to membrane proteins (Fig. 1b). This group has about 10-fold less alkaline phosphatase activity than the first group. When the supernatant is filtered, there is a significant reduction in alkaline phosphatase activity. Again, we believe that some fusion proteins bind weakly to the cell membrane and would be detectable in the supernatant, even after filtration. (iii) The third category consists of mutants harboring insertions in gene se-

quences that encode products homologous to cytoplasmic proteins (Fig. 1c). These fusion strains have only cell-associated alkaline-phosphatase activity. Only one protein was detectable, at moderate levels: a putative uroporphyrin III C-methyltransferase CysG, similar to that of *C. efficiens*. Since this putative protein is involved in coenzyme metabolism (as with COG 0007.2), being a cytoplasmic protein, it seems that the colony method of screening is not optimal for the identification of fusion proteins that do not remain associated with the cell surface, since it does not eliminate background signals.

This was the first time that the TnFuZ transposition system was used to identify genes coding for exported proteins of *C. pseudotuberculosis*. We identified a great diversity of proteins, including a fimbrial subunit, a protein related to iron uptake, adhesins, and proteins involved in transport, as well as hypothetical proteins and two unknown proteins. These data now constitute the largest collection of exported proteins identified in corynebacteria through genetic screening. Many of the genes that were identified could play an important role in the biology of *C. pseudotuberculosis*, and they are promising targets for the development of attenuated vaccine strains. Further experiments are now in progress in our laboratory in order to determine whether or not these exported proteins are involved in the virulence of this pathogen. We have also been conducting immunization assays to determine if these mutant strains can confer protective immunity against this bacterium.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The ~200-bp nucleotide sequences of interrupted *C. pseudotuberculosis* T1 genes from the 34 selected PhoZ<sup>+</sup> mutants have been deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) under accession numbers CZ171041 to CZ171074.

We are grateful to Michel G. Caparon (Washington University Medical Center) for providing the TnFuZ-containing plasmid pCMG8 and to Philippe Langella, Yves Le Loir, Pascale Serror, and John Glen Songer for critical reading of various drafts of this paper.

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil; PADCT/CNPq: 620004/2004-5), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos 01.04.760.00), and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil).

#### REFERENCES

1. Billington, S. T., P. A. Esmay, J. G. Songer, and B. H. Jost. 2002. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**:41–45.
2. Cerdeño-Tárraga, A. M., A. Efstratiou, L. G. Dover, M. T. Holden, M. Pallen, S. D. Bentley, G. S. Besra, C. Churcher, K. D. James, A. De Zoysa, T. Chillingworth, A. Cronin, L. Dowd, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. M. Rutherford, N. R. Thomson, L. Unwin, S. Whitehead, B. G. Barrell, and J. Parkhill. 2003. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* **31**:6516–6523.
3. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537–544.
4. Dorella, F. A., E. M. Estevam, P. G. Cardoso, B. M. Savassi, S. C. Oliveira, V. Azevedo, and A. Miyoshi. 2006. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **114**:298–303.
5. Dorella, F. A., L. G. C. Pacheco, S. C. Oliveira, A. Miyoshi, and V. Azevedo. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* **37**:201–218.
6. Finlay, B. B., and P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**:718–725.
7. Finlay, B. B., and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136–169.
8. Gibson, C. M., and M. G. Caparon. 2002. Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:928–932.
9. Granok, A. B., D. Parsonage, R. P. Ross, and M. G. Caparon. 2000. The RofA binding site in *Streptococcus pyogenes* is utilized in multiple transcriptional pathways. *J. Bacteriol.* **182**:1529–1540.
10. Ikeda, M., and S. Nakagawa. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:99–109.
11. Li, T., I. Johansson, D. I. Hay, and N. Strombergi. 1999. Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motifs in salivary proteins. *Infect. Immun.* **67**:2053–2059.
12. Litwin, C. M., and S. B. Calderwood. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:137–149.
13. Mattos-Guaraldi, A. L., L. C. D. Formiga, and G. A. Pereira. 2000. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes Infect.* **2**:1507–1512.
14. Model, P., G. Javanovic, and J. Dworkin. 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Mol. Microbiol.* **24**:255–261.
15. Moreira, L. D. O., A. F. Andrade, M. D. Vale, S. M. Souza, R. Hirata, Jr., L. M. Asad, N. Asad, L. H. Monteiro-Leal, J. O. Previato, and A. L. Mattos-Guaraldi. 2003. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrate of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5907–5913.
16. Nishio, Y., Y. Nakamura, Y. Kawarabayasi, Y. Usuda, E. Kimura, S. Sugimoto, K. Matsui, A. Yamagishi, H. Kikuchi, K. Ikeo, and T. Gojobori. 2003. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* **13**:1572–1579.
17. Oram, D. M., A. Avdalovic, and R. K. Holmes. 2002. Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). *J. Bacteriol.* **184**:5723–5732.
18. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
19. Schmitt, M. P., and E. S. Drazek. 2001. Construction and consequences of direct mutations affecting the hemin receptor in pathogenic *Corynebacterium* species. *J. Bacteriol.* **183**:1476–1481.
20. Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun. 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:2626–2633.
21. Sweigard, J. A., F. G. Chumley, and B. Valent. 1992. Cloning and analysis of *CUT1*, a cutinase gene from *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* **232**:174–182.
22. Sweigard, J. A., F. G. Chumley, and B. Valent. 1992. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gen. Genet.* **232**:183–190.

# SEÇÃO III

## 1. Hipóteses do trabalho

Vacinas constituídas de bactérias vivas atenuadas e/ou bactérias mortas têm se mostrado bastante eficientes no combate a diversas doenças bacterianas. Considerando as diferentes estratégias propostas neste manuscrito, levantamos as seguintes hipóteses:

“As linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* geradas por mutagênese aleatória são atenuadas *in vivo* e capazes de induzir uma resposta imune que leva à proteção dos animais imunizados, contra a infecção. E podem, portanto, ser utilizadas como vacinas vivas atenuadas contra a LC”.

“As linhagens selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis* são capazes de gerar uma resposta imune protetora nos animais imunizados, contra a infecção, podendo ser utilizadas como vacinas inativadas contra a LC”.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho de tese foi avaliar *in vivo* o potencial vacinal das linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis* contra a infecção, em modelo murino.

### 2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos estão divididos de acordo com cada estratégia, vacinas vivas recombinantes e vacinas inativadas, proposta e testada, como se segue:

#### 2.2.1. Desenvolvimento de uma vacina viva recombinante contra *C. pseudotuberculosis* em modelo murino

- a. Ensaio de imunização, em modelo de infecção murino, empregando as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis*:
  - i. Seleção das linhagens mais promissoras de acordo com a capacidade de conferirem imunidade protetora contra o desafio com a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis*;
- b. Caracterização molecular das linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* selecionadas no ensaio anterior;
- c. Novos ensaios de imunização utilizando as linhagens selecionadas;
- d. Avaliação imunológica induzida nos animais imunizados com as linhagens selecionadas:
  - i. Análise da produção de imunoglobulinas, IgG, IgG1 e IgG2a, a partir das amostras de soro coletadas dos animais imunizados;
  - ii. Avaliação do perfil de citocinas, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, produzidas a partir da estimulação da cultura de esplenócitos dos animais imunizados;
- e. Ensaio de interação das linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* selecionadas com células murinas:
  - i. Avaliação do padrão de aderência das linhagens à monocamada de células murinas;
  - ii. Análise da viabilidade intracelular dos mutantes nestas mesmas células.

### **2.2.2. Desenvolvimento de uma vacina inativada contra *C. pseudotuberculosis* em modelo murino**

- a. Inativação das linhagens selvagens e virulentas de *C. pseudotuberculosis*;
- b. Ensaios de imunização, em modelo de infecção murino, empregando as linhagens selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis*:
  - i. Seleção das linhagens mais promissoras de acordo com a capacidade das mesmas conferirem imunidade protetora contra o desafio com a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis*;
- c. Novos ensaios de imunização utilizando as linhagens selecionadas;
- d. Avaliação imunológica induzida nos animais imunizados com as linhagens selecionadas;
  - i. Análise da produção de imunoglobulinas, IgG, IgG1 e IgG2a, a partir das amostras de soro coletadas dos animais imunizados;
  - ii. Avaliação do perfil de citocinas, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, produzidas a partir da estimulação da cultura de esplenócitos dos animais imunizados.



# SEÇÃO IV

## **Estratégia I - Desenvolvimento de uma vacina viva recombinante contra *C. pseudotuberculosis* em modelo murino**

### **1. Material e Métodos**

#### **1.1. Linhagens de *C. pseudotuberculosis* e condições de cultivo**

Foram utilizadas linhagens mutantes previamente obtidas de *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006b). Os mutantes foram cultivados em meio BHI suplementado com o antibiótico canamicina (Km; 25 µg/ml) e 0,5% de Tween 80, por 72 horas a 37°C sob agitação. Para as culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico e o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (B.C.I.P.; 40µg/ml) foram adicionados ao meio de cultura.

#### **1.2. Modelo animal**

Foram empregados camundongos BALB/c com idades entre seis a oito semanas, susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Por razões éticas, todos os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical quando moribundos.

#### **1.3. Ensaio de imunização**

Foram realizados experimentos-piloto iniciais para a padronização de parâmetros tais como: cálculo da dose letal (LD<sub>50</sub>) a ser empregada nos ensaios de imunização, o volume das culturas a serem inoculados nos animais; via de inoculação mais adequada; intervalos entre as imunizações. A partir destes resultados foi definido o cronograma de imunizações.

Num dia 0, dois grupos de camundongos foram imunizados, cada um, com uma vacina comercial, Glanvac™3 ou Biodectin. Quatro semanas depois, no dia 28, esses mesmos grupos de camundongos receberam uma segunda dose dessas vacinas (revacinação) e diferentes grupos de animais receberam cada um, uma dose das diferentes linhagens mutantes a serem testadas. Quatorze dias após o segundo período de imunização (dia 42) todos os animais foram desafiados com a linhagem selvagem virulenta MC-6.

As 21 diferentes linhagens, obtidas por meio de transposição gênica utilizando o TnFuZ (Dorella *et al.*, 2006b), que serão utilizadas nos ensaios de imunização estão brevemente descritas na TABELA 1.

**TABELA 1: Descrição das linhagens recombinantes empregadas nos ensaios de imunização.**

<b>Linhagem</b>	<b>Proteína codificada</b>
CP01 <sup>a</sup>	Cistationina gama-sintase
CP02 <sup>a</sup>	Proteína hipotética CEO202
CP03 <sup>a</sup>	Provável adesina relacionada à família Sdr
CP04 <sup>a</sup>	Provável sódio-soluto simporter
CP05 <sup>a</sup>	Provável sistema de dois componentes sensor quinase
CP06 <sup>a</sup>	Proteína hipotética NCgl2271
CP07 <sup>b</sup>	Provável proteína de membrana
CP08 <sup>a</sup>	Leucil tRNA sintetase
CP09 <sup>c</sup>	Provável subunidade fimbrial
CP11 <sup>a</sup>	Fosforibosil-ATP pirofosfatase
CP13 <sup>c</sup>	Provável proteína (secretada) ligada ao sistema de transporte de ferro
CP15 <sup>a</sup>	Aspartato amônia liase
CP16 <sup>a</sup>	Provável subunidade menor da metilmalonil-CoA mutase
CP23 <sup>a</sup>	Proteína hipotética de membrana
CP25 <sup>a</sup>	Provável uroporfirina III C-metiltransferase CysG
CP26 <sup>a</sup>	L-serina desidratase I
CP28 <sup>d</sup>	Desconhecida
CP29 <sup>d</sup>	Desconhecida
CP30 <sup>a</sup>	Proteína do operon do glicogênio
CP33 <sup>a</sup>	Provável transportador prolina-betaína
CP34 <sup>b</sup>	Provável proteína de membrana

<sup>a</sup>Mutantes pertencentes à categoria de proteínas citoplasmáticas de acordo com o produto codificado pelo gene interrompido pela inserção do transposon.

<sup>b</sup>Mutantes pertencentes à categoria de proteínas de membrana.

<sup>c</sup>Mutantes pertencentes à categoria de proteínas de exportadas.

<sup>d</sup>Mutantes pertencentes à categoria de proteínas de função desconhecida.

Num primeiro experimento, grupos de cinco camundongos BALB/c foram formados. Testes de imunização com oito linhagens recombinantes, selecionadas com base na relação entre o produto que codificam e a virulência de *C. pseudotuberculosis*, foram realizados. Os mutantes selecionados foram:

- CP03 (adesina);
- CP04 (sódio-soluto simporter);
- CP05 (sistema de dois componentes sensor quinase);
- CP07 (proteína de membrana);
- CP08 (leucil tRNA sintetase);

- CP09 (subunidade fimbrial);
- CP13 (proteína secretada ligada ao do sistema de transporte de ferro);
- CP28 (proteína sem homologia no banco de dados).

Um grupo vacinado com PBS (controle negativo), um grupo imunizado com a vacina comercial Glanvac™3 (controle positivo; Pfizer Animal Health, Austrália), além de um grupo controle negativo que recebeu uma dose da linhagem T1 (linhagem selvagem parental utilizada na obtenção dos mutantes) também fizeram parte do experimento.

Os camundongos foram imunizados intraperitonealmente com 100 µl das respectivas culturas contendo 10<sup>6</sup> UFC das linhagens mutantes, de acordo com o cálculo da LD<sub>50</sub>. Os camundongos do grupo Glanvac™3 receberam duas doses de 300µl da vacina com intervalos de quatro semanas entre cada uma delas.

#### **1.4. Desafio e determinação do nível de proteção**

Os animais imunizados foram desafiados pela via intraperitoneal com 10<sup>6</sup> UFC/ ml da linhagem virulenta MIC-6, de acordo com o cronograma pré-estabelecido. A proteção conferida pelo processo de imunização nos camundongos foi avaliada de acordo com a taxa de sobrevivência dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* comparados àqueles imunizados somente com PBS. Esta avaliação deu-se num intervalo de quatro semanas após o desafio, durante o qual os animais foram acompanhados diariamente e os óbitos contabilizados. Os camundongos que apresentaram sinais de morbidez, de médio a avançados, foram sacrificados por deslocamento cervical e contabilizados como óbitos.

Após a conclusão deste experimento partimos para um experimento abrangendo todas as linhagens apresentadas na TABELA 1, divididas em grupos de cinco camundongos. Este experimento foi repetido três vezes e permitiu a seleção das linhagens mais promissoras, ou seja, aquelas que apresentaram os melhores níveis de proteção. A partir desta seleção, foram realizados novos experimentos somente com as linhagens selecionadas, em maior escala, onde foram incluídas as análises descritas a seguir.

#### **1.5. Caracterização molecular das linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* selecionadas**

Foram realizadas análises moleculares, *in silico*, utilizando-se a seqüência do gene interrompido pela inserção do transposon TnFuZ nos mutantes que apresentaram os

resultados mais promissores. A finalidade de tais análises foi relacionar a proteína ausente nestes mutantes com a atenuação e conseqüente capacidade protetora que os mesmos apresentaram nos ensaios de imunização em camundongos.

#### **1.5.1. Obtenção da seqüência completa do gene interrompido nos mutantes selecionados**

A partir das seqüências parciais (extremidade 5') dos genes interrompidos nos mutantes selecionados, obtidas por Dorella e colaboradores (2006b), fez-se uma busca por similaridade (Blastn) através do alinhamento entre estas seqüências parciais e as seqüências codificadoras preditas no genoma de *C. pseudotuberculosis* (disponível na base de dados da Rede Genoma de Minas Gerais - RGMG). Esta busca foi realizada no programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), utilizado na anotação do genoma de *C. pseudotuberculosis*, que está sendo realizado por nosso grupo através da RGMG.

#### **1.5.2. Análise de similaridade**

As seqüências completas de nucleotídeos foram comparadas com o banco de dados de seqüências nucleotídicas (Blastn) e protéicas (Blastx) depositadas no GenBank utilizando o algoritmo "*Basic Local Alignment Search Tool*" (BLAST) disponível no sítio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os dados referentes às proteínas codificadas foram obtidos no UniProtKb (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

#### **1.5.3. Modificações pós-traducionais**

A predição de peptídeo sinal foi realizada utilizando o programa SignalP 3.0 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Motivos transmembrânicos foram analisados pelos programas SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) e TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>).

#### **1.5.4. Domínios conservados**

A busca por domínios conservados foi realizada utilizando o programa InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).

### **1.5.5. Outras análises**

O peso molecular e o ponto isoeletrico das proteínas foram calculados com o programa Compute PI/Mw ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

### **1.6. Coletas de sangue**

Os animais imunizados com as linhagens recombinantes selecionadas foram submetidos à coleta de sangue nos dias 0 e 14 contados a partir do período de imunização com as mesmas. O sangue foi coletado da veia do plexo retro-orbital com o auxílio de pipetas Pasteur. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a dosagem de anticorpos específicos por ELISA.

### **1.7. Detecção de imunoglobulinas a partir das amostras de soro dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis*.**

O soro dos camundongos imunizados foi utilizado em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de imunoglobulinas do tipo IgG e seus subtipos IgG1 e IgG2a. Placas de 96 poços de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante da cultura de 72 horas de *C. pseudotuberculosis* linhagem MIC-6 (concentração aproximada de 4 $\mu\text{g/ml}$ ). As placas foram então incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T20 (PBS 1X pH 7.4; 0,1% de Tween 20) e bloqueadas com 200  $\mu\text{l}$ /poço de PBS-T20 e 10% de leite desnatado por duas horas, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os poços foram lavados três vezes com PBS-T20. Foram adicionados 100  $\mu\text{l}$ /poço das amostras dos soros de camundongos, na diluição de 1:50, em duplicatas. Após uma hora de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  e três lavagens com PBS-T20, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$ /poço dos anticorpos anti-mouse IgG (Promega) na diluição de 1:10.000, anti-mouse IgG1 (Promega) na diluição 1:5.000 e anti-mouse IgG2a (Promega) na diluição 1:2.000, respectivamente. Após uma hora de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  e três lavagens com PBS-T20, 100  $\mu\text{l}$ /poço de solução reveladora (200 pmoles orto-fenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 50ml de tampão citrato-fosfato pH5 e 0,05%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram adicionados. A reação foi interrompida pela adição de 50 $\mu\text{l}$  da solução de parada contendo 5% de ácido sulfúrico. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA).

### **1.8. Cultura de células esplênicas para dosagem de citocinas**

Duas semanas após a última imunização, cinco camundongos de cada grupo testado foram sacrificados por deslocamento cervical. Esplenócitos isolados dos baços macerados foram lavados duas vezes em PBS estéril. As suspensões celulares do baço obtidas de cada animal foram colocadas em RPMI completo (meio RPMI 1640- Gibco BRL- suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina – LGC Bio) e contadas em câmara de Neubauer, ajustando a concentração de células para  $5 \times 10^6$  células/ml e assegurando-se a viabilidade através da exclusão com o corante Tripán Blue. Foram distribuídos 100µl de células na concentração adequada em triplicata em placas de 96 poços. As células foram estimuladas com: meio RPMI, meio BHI, concanavalina A (ConA) 2µg/ml, sobrenadante da cultura de 72 horas de *C. pseudotuberculosis* (4µg/ml) e cultura de 72 horas de *C. pseudotuberculosis* tratada com 1% de formalina (10µg/ml). As células foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por no máximo 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 24 horas para análise da produção de IL-4 e após 72 horas para análise da produção de IL-10, IFN-γ e TNF-α e estocado a -20°C até sua utilização.

### **1.9. ELISA para detecção de citocinas**

Para a obtenção da medida dos níveis de citocinas local, foram utilizados os kits Duo Set ELISA Development System para as citocinas INF-γ, TNFα, IL-4 e IL-10, adquiridos comercialmente (R&D Systems) e usados de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

### **1.10. Ensaios de interação dos mutantes de *C. pseudotuberculosis* selecionados com células murinas J774**

Sendo *C. pseudotuberculosis* uma bactéria intracelular, ela tem que ser capaz de, durante o curso da infecção, aderir-se à parede da célula hospedeira, internalizar-se e sobreviver dentro deste “ambiente” causando então a doença. Deste modo, com o intuito de entender as modificações acarretadas pelas mutações sofridas pelas linhagens selecionadas, estudamos o padrão de adesão destas comparados à linhagem parental T1, bem como sua viabilidade no interior de células J774 de camundongos. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a equipe do Dr. Raphael Hirata Jr, na UERJ.

### 1.10.1. Preparação das monocamadas de células J774

A linhagem celular J774, originada de linfoma murino, que diferencia-se em macrófagos, foi cultivada em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado com antimicrobianos (50µg/ml de gentamicina e 2,5µg/ml de fungizona) e 5% de Soro Fetal Bovino. As células foram mantidas sob temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, no interior de garrafas plásticas para a cultura de células (*Costar*). As monocamadas confluentes foram tripsinizadas em intervalos de dois dias, utilizando-se a solução isotônica (salina) contendo tripsina 0,2% (p/v) e EDTA 0,02% (p/v). Após aproximadamente três minutos de interação, a tripsina foi removida da garrafa e nova partida de meio DMEM completo foi adicionado à monocamada e agitada vigorosamente para que as células soltassem do fundo da garrafa plástica. A suspensão foi contada em câmara de Neubauer e diluída de modo a conter em torno de  $1 \times 10^6$  células/ml. Para os ensaios de aderência, 500 µl a suspensão celular (em torno de  $5 \times 10^5$  células/ml) foram distribuídos em microplacas de 24 poços. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas, até que a monocamada apresentasse acima de 95% de confluência.

### 1.10.2. Ensaios de interação microbiana com células J774

As linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio líquido BHI e incubadas por 24h a 37°C. Após três lavagens das amostras com solução salina tamponada de Dulbecco (PBS, 0,01M, pH7.4, contendo 10mM de MgCl<sub>2</sub> e 10 mM CaCl<sub>2</sub>) estéril, as linhagens foram ressuspensas em meio DMEM sem aditivos. As suspensões padrão bacterianas foram diluídas em meio DMEM de modo à obtenção de turvação bacteriana de 0.1 em comprimento de onda de 580 nm (cerca de  $10^7$  UFC/ml) em espectrofotômetro de tubos de vidro (Micronal 580D). A suspensão foi em seguida diluída 1:10 (em torno de  $5 \times 10^6$  UFC/ml) em DMEM, para uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 bactérias por célula J774, em volume final de 500µl. Após interação por 1, 3 e 6 horas, alíquotas dos sobrenadantes foram removidas, diluídas e contadas para a determinação das UFC/ml. Em seguida as monocamadas foram lavadas seis vezes com PBS de forma branda, para que as células não se soltassem do fundo, e ressuspensas em 500µl tampão de lise [(PBS 0.1% de Triton X100 (BioRad)]. O lisado foi diluído para a contagem das UFC/ml e semeados em placas de BHI-ágar (Difco). O percentual de células aderidas foi determinado a partir do somatório das UFC no sobrenadante + UFC associadas às monocamadas (assumido como 100% dos microrganismos) de acordo com a seguinte fórmula:  $\text{UFC associadas às monocamadas} / \text{UFC no sobrenadante} + \text{UFC associadas às monocamadas} \times 100$ .



### **1.10.3. Ensaio de viabilidade intracelular**

Os ensaios de viabilidade intracelular foram realizados através da exclusão pela gentamicina. Após os tempos de incubação de 1, 3 e 6 horas, as monocamadas foram lavadas de forma branda por seis vezes e nova partida de meio DMEM contendo 150µg de gentamicina (Sigma) foi adicionada por uma hora. Controles da associação às monocamadas também foram realizados, da forma descrita anteriormente. Após três lavagens com PBS, as monocamadas foram lisadas com tampão de lise, diluídos em PBS e plaqueados em BHI-ágar, para a determinação das UFC. O percentual de microrganismos viáveis intracelulares foi determinado a partir do controle das bactérias associadas (sem a exposição à gentamicina).

### **1.11. Análises estatísticas**

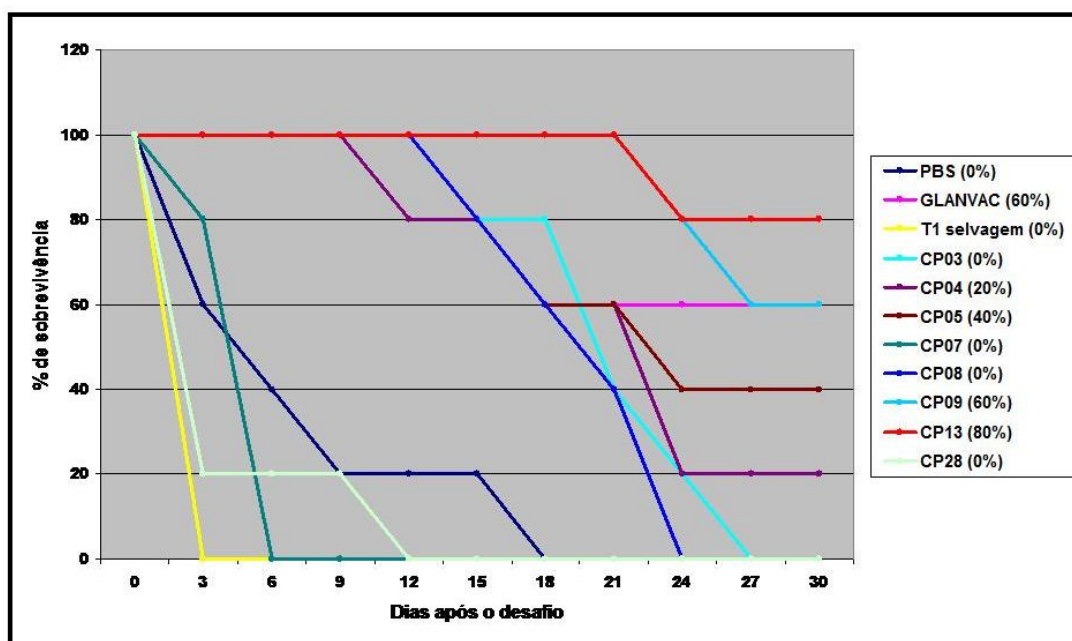
Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$ ) desvio padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada utilizando-se o teste ANOVA, seguido do teste “Bonferroni” (análise de proteção, produção de imunoglobulinas e citocinas) ou “Turkey” (análises de aderência e viabilidade intracelular), ambos disponíveis no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Um valor de  $p < 0,05$  foi utilizado como limite da significância estatística.

## 2. Resultados

### 2.1. Imunização com as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* e proteção contra o desafio com a linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*

Os experimentos realizados com as linhagens selvagens nos permitiram identificar a tolerância máxima de  $10^6$ UFC/dose de *C. pseudotuberculosis* em testes com os camundongos BALB/c. Esta dose foi então utilizada em todos os ensaios de imunização em que foram testadas as linhagens recombinantes.

Duas semanas após a imunização com as linhagens recombinantes, os camundongos foram desafiados com a linhagem selvagem MIC-6 da *C. pseudotuberculosis* pela via intraperitoneal. Os resultados referentes a este primeiro experimento estão representados na FIGURA 1.

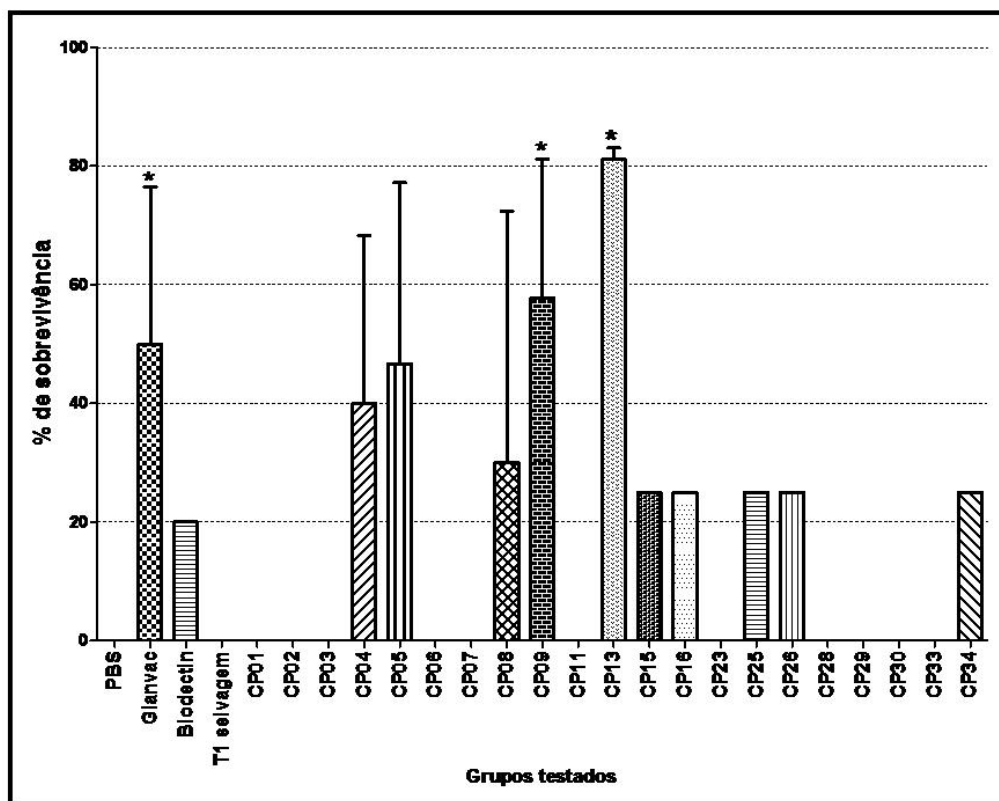


**FIGURA 1:** Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes no primeiro ensaio de imunização. Os dados no gráfico mostram o resultado de um experimento representativo, utilizando cinco camundongos por grupo, no qual a sobrevivência dos animais (em porcentagem) foi acompanhada até 30 dias após o desafio com a linhagem selvagem MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Os valores finais da porcentagem de sobrevivência para cada grupo estão apresentados, entre parêntese, na legenda.

Observando-se o gráfico podemos notar que ao longo dos 30 dias após o desafio os animais imunizados com a linhagem recombinante CP13 apresentaram as taxas mais altas

de proteção (80%) contra a infecção pela bactéria selvagem. Os camundongos imunizados com o mutante CP09 apresentaram 60% de proteção contra o desafio, o mesmo resultado observado no grupo de camundongos imunizados com a vacina comercial Glanvac™3. Houve uma grande variação nos resultados apresentados pelos demais grupos testados, no entanto, estes não apresentaram os mesmos bons índices de proteção observados para os mutantes CP09 e CP13.

Este primeiro resultado nos levou a testar todas as linhagens recombinantes em novos ensaios de imunização. O objetivo destes novos testes foi o de assegurar os dados anteriormente observados e selecionar, dentre todas as linhagens, aquelas mais promissoras em relação aos níveis de proteção conferidos aos animais. Novamente foram formados grupos de cinco camundongos e este novo ensaio foi repetido por três vezes. A média dos resultados está apresentada na FIGURA 2.



**FIGURA 2: Representação gráfica dos índices de proteção conferidos aos animais imunizados com as linhagens recombinantes após o desafio com a linhagem selvagem.** Os dados apresentados no gráfico mostram a porcentagem de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes ao final de quatro semanas após o desafio com a linhagem selvagem. Os dados mostram a média e o desvio padrão de três experimentos representativos, utilizando cinco camundongos por grupo em cada experimento. \*significativo em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0,05$ ).

Pela análise do gráfico podemos observar que, novamente, as linhagens CP09 e CP13 se destacaram no que diz respeito à capacidade de proteção conferida aos animais contra a infecção com a linhagem selvagem. A proteção oferecida pelos mutantes CP09 e CP13 foi bastante significativa em relação ao grupo controle PBS e se destacou em relação a todos os outros grupos imunizados com os demais mutantes, conferindo taxas de 57% e 81%, respectivamente, de sobrevivência dos camundongos. Podemos destacar, ainda, que estes índices de proteção foram superiores àquele conferido pela vacina comercial Glanvac™3, 50%.

A proteção oferecida pelos mutantes CP04, CP05 e CP08 variou, efetivamente, de 30% a 50%, não sendo significativa em relação ao grupo controle PBS. Os demais mutantes testados não chegaram a superar os 25% de proteção, sendo que, 11 dos 22 testados não conferiram proteção a nenhum dos camundongos de seus respectivos grupos de imunização (CP01, CP02, CP03, CP06, CP07, CP11, CP23, CP28, CP29, CP30, CP33). A vacina comercial Biodectin® ofereceu somente 20% de proteção aos animais que a receberam como tratamento.

## **2.2. Caracterização molecular das linhagens CP09 e CP13 selecionadas**

De posse dos dados obtidos foi possível selecionar os mutantes CP09 e CP13 como os candidatos mais promissores a serem utilizados como vacinas vivas atenuadas. Sendo assim, a seqüência codificadora dos genes interrompidos nestes mutantes foi submetida a diversas análises, *in silico*, com o objetivo de tentar correlacionar a proteína ausente nestas linhagens com a capacidade protetora que as mesmas apresentaram.

### **2.2.1. O mutante CP09**

A seqüência completa do gene interrompido no mutante CP09 foi obtida por análise de similaridade entre a seqüência parcial anteriormente obtida (Dorella *et al.*, 2006b) e a seqüência completa do genoma de *C. pseudotuberculosis* (disponível na base de dados da Rede Genoma de Minas Gerais) realizada pelo programa Artemis.

Obtivemos uma seqüência final de 1443 nucleotídeos, como mostrada na FIGURA 3, cujo sítio de inserção do transposon se encontra entre os nucleotídeos 692 (C) e 693 (G).

```

>CP09
1   GTGAACAGGTTCTCTTGCGCTACGCGCTCTGTAACTTTTGCTGCAATTGTTGGTTTTGTCT 60
61  CTTGGACTCGGCGGGGCTCCGGCAGTCGTTGCCAGGACATTCTTATAGCTGCTCCCGTG 120
121 AAAGCAAACATTGATTTTGAAAGAAAAGGCTCCCTCACCTTTATAAGAAAAGCGGCGCG 180
181 GAATCGGGTGAGCATGCAACTGGTCACCTAATGGAGAAATGTTCCCTGGAAAGCCTTTAAAT 240
241 GCGTGAAATTTAAAGCTACAAAAATCAATGTTGATCTTAAAACAGATGATTGGGCAAAA 300
301 TTTCCATAAAATGCTGAAGATGCGAAAAATAAATTACGACTGTAACCTATGAACAAACT 360
361 ACGACTGGTGAAGGGGTTGCAAAGTTTGAGATTTGCCACTGGGTCTTTATCTTGTGGAG 420
421 GAGACAGAGGCTCCTGAAGGGGTAGTGAAAGGGGCACCGTTTATAGTTTCAATTCCTATG 480
481 GTAAGCGCTGCGAGCAATCTTGAATTACGAAATAGTTGCGTATCCAAAAAATTCGGAA 540
541 ACTAAAGTCGAAAAATCAGTGAAAGATGCTGATAAGAAATATTCAAGATCTTTACCTCTAT 600
601 ACGATTACTGCAGATGCTCCGAATTTTAAAGATCCAAAGAAGTTAACTAAGTTTATTTTC 660
661 TCAGATAAAC TTGATGATCGACTGAAAAATCC*GAAGGCTACAGAAGTAAAAGCCGGTGAT 720
721 GTAACCTAGCCGAGGGTGACTTCACCTGAGTCTTTTGTGATGGGCTCATAAAGTTGAG 780
781 ATAAGTAAAAAGGGCTTCTAAAAGTGGCATCTGGGGTGAAGGTCTCTTTGACCTTTAAT 840
841 GTCGCTCGTAAAGAAGTCGGAAATAGTGTGAACTCGTTAACTCTGCTGATGTTATTTT 900
901 AATAACCCAAACACTGAGGAAGACATAACACAGAAGCAAACGAAGCTAAAACCTATCAT 960
961 GGTAAGTTAAAAATAGTTAAAAAAGATGCAAAAGAAATTGATAAAGTCTTGAAGGTGCG 1020
1021 ACTTTTGAGCTTTATCGTTGTGAAGACCCCGATACACTGAAATCTAAAATATCCATCAAT 1080
1081 GGACAGTCCGCTTGGACCAC TGGTAAAGACGGAACGTCAACATTGATGGGCTGCATGTT 1140
1141 ACCGATGTCGAAGACAATGATAAGTTTCAATGAAAAGAAATATTGCTTAAAGGAGACTGCG 1200
1201 GTCCTGCGGGTTATTTCGCTAATGGAGAAACCGGTTGCTTTTACGATGACTCGTGATGAA 1260
1261 CTTGCACAAGTCGCAGAGGGTGATGATGCGGTGACCTTAGTTAAAAAGGTTGAAAACGTT 1320
1321 AAACATGATACTCCGAATCTTCCAATGACAGGTGGCGCAGGTATCGGTATTCTTGCAGCA 1380
1381 CTTGGTGCCTAATCATCGGTGCTGGAGCATGGTTGGCACGTCGTAACCTCAGCTAAAAAC 1440
1441 TAG 1443

```

**FIGURA 3: Seqüência nucleotídica do gene interrompido no mutante CP09.** A seqüência consiste de 1443 nucleotídeos. Entre os nucleotídeos marcados em amarelo houve a inserção do transposon TnFuZ. O asterisco marca exatamente a posição da inserção, entre os nucleotídeos 692 e 693.

A busca por similaridade revelou que este gene codifica uma provável subunidade fimbrial encontrada em *C. diphtheriae* NCTC 13129. O resultado da análise nucleotídica não revelou qualquer similaridade da seqüência obtida com aquelas do banco de dados. As análises de similaridade protéica resultaram em um E-value bastante significativo de 2e-134, um Score de 1242 e 57% de identidade de seqüência. Essas análises estão mostradas na FIGURA 4.

```

> [G] ref|NP_938626.1| [G] putative fimbrial subunit [Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129]
emb|CAE48740.1| [G] Putative fimbrial subunit [Corynebacterium diphtheriae]
Length=490

GENE ID: 2650497 DIP0235 | putative fimbrial subunit
[Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129] (10 or fewer PubMed links)

Score = 483 bits (1242), Expect = 2e-134
Identities = 265/457 (57%), Positives = 323/457 (70%), Gaps = 11/457 (2%)
Frame = +1

Query 13 SCATRSVTFAAIVGLSLGLG--GAPAVVAQDILIAAPVKANIDFERKGSLLTYKKSGAES 186
Sbjct 5 S RSVTFAA+ GLSLG+ GA A+ + + +ANIDFERKGSLLT+KK GAES 64

Query 187 GEHATGHLMENVPKPLNGVVKFKATKINVDLKTDDWAKFPKNAEDAKNKLttvtyeqttt 366
+ ATG M++V G+PLNGV FK TK+N DL+ DWAKFPK A DAK T+ T E T+
Sbjct 65 EKRTATGKEMDDVAGEPLNGVTFKITKLNFDLQNGDWAKFPKTAADAKGHETSTTKEVETS 124

Query 367 gegvAKFGDLPLGLYLVEETEAPGEGVVKGAPFIVSIPMVSAASNSWNYEIVAYPKNSETK 546
G G A F +L LG+YLVEET+AP+G+V GAPFIVSIPMV+ AS++WNY +VAYPKN+ETK
Sbjct 125 GNGTAVFDNLDLGIYLVEETKAPDGIIVTGAPFIVSIPMVNEASDAWNYNVVAYPKNTEVK 184

Query 547 VEKSVKDADKNIQDLYLYTITADAPNFKDPKLTKEFIFSDKLDLDRLENPKATEVKAGDVT 726
EK+VKDAD+NIQD Y YTI ADAP + KRLT F F D+LD RL+ K TEVKAGD
Sbjct 185 TEKTVKDADQNIQDAYTYTIKADAPTGWKDKKLTAFRFEDELDRKLDLDFQKVTVEVKAGDVT 244

Query 727 LAEGDFT--ESFVDG-LYKVEISEKGLLKVASGVKVSILTFNVARKEVGNVELVNSADV 897
L D+T + DG V ++++GL KV SG K+SLTF V RKEVGN+ EL N ADVI
Sbjct 245 LGTSDYTVNDPATDGNKLVVTLTDEGLKVKVSGDKMSLTFEVKREVGNTTELKNRADVI 304

Query 898 FNNPNTTEEDITQKTNEAKTYHGKLVKVKDAKEIDKVLGATFELYRCEDPDTL-KSKIS 1074
FNNPNT++++ KINE TYHGKLVKVKD KE KVL+GA FELY+C L K ++
Sbjct 305 FNNPNTDKEVKNKTNEVVTYHGKLVKVKDGKEAGKVLKGAEFELYQCTSAAVLKGKPLT 364

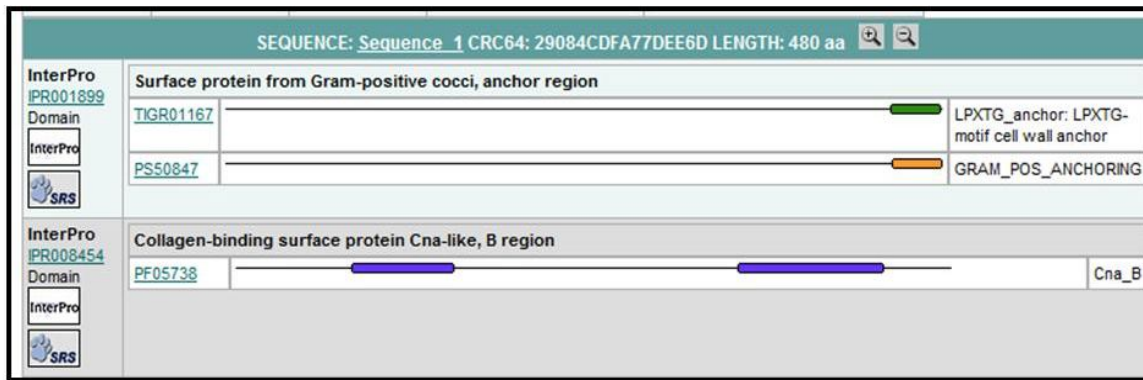
Query 1075 INGQSAWTTGKDGTVTIDGLHVIDVEDNDKF--IEKKYCLKETAAPAGYSLMEKPVA--- 1239
++G WTTG DGT TIDGLHVID ED + KK+CLKET APAGY+L + V
Sbjct 365 VDGVKKWTGDDGTFTIDGLHVIDFEDGKEAAPATKFKFLKETAAPAGYALPDPNVTEIE 424

Query 1240 FTMRDELAQVAEGDDAVTLVKKVENVKHDTPNLPM 1350
FT + EGDD VTLV +++N+K TP LPMT
Sbjct 425 FTRAKISEKDKFEGDDEVTLVSEIKNIKQGTPLPMT 461

```

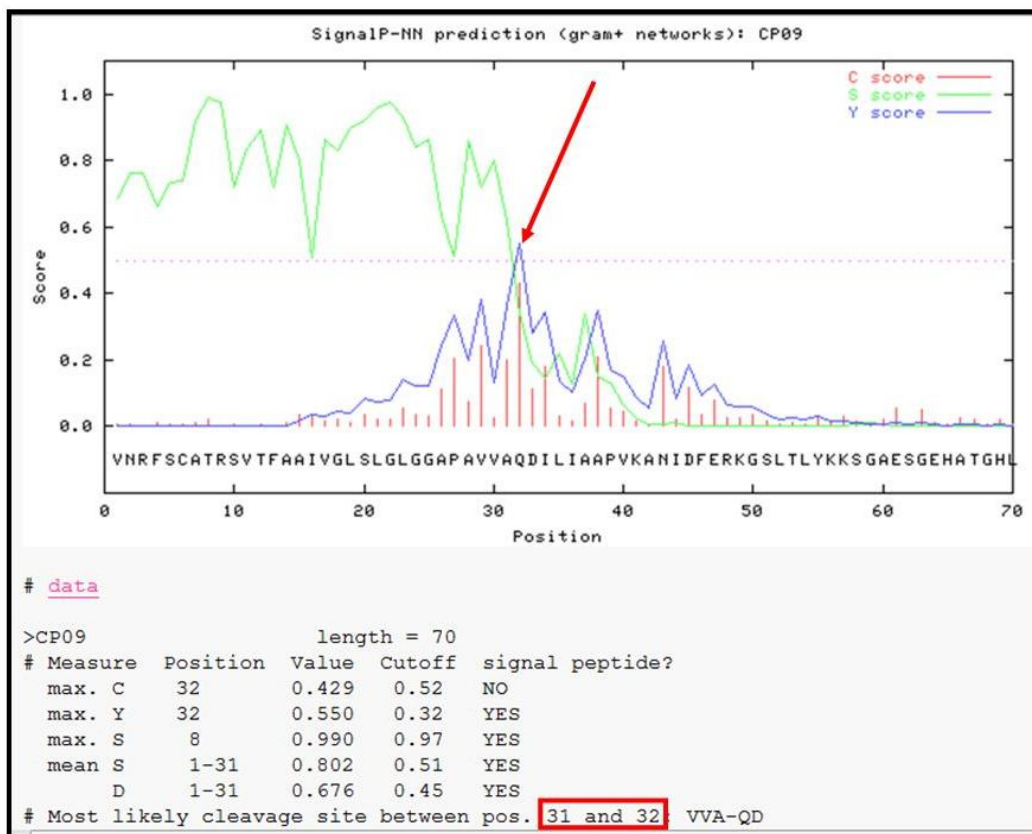
**FIGURA 4: Análise de similaridade protéica obtida por Blastx.** A análise revelou que o gene interrompido pelo transposon no mutante CP09 codifica uma provável subunidade fimbrial encontrada em *C. diphtheriae* NCTC 13129.

As análises realizadas no programa InterProScan revelaram que a proteína codificada pelo gene interrompido possui dois domínios, “Collagen-binding surface protein Cna-like” presente em *Staphylococcus aureus* e uma região de ancoramento de proteínas de superfície de cocos Gram-positivos. Ambos os motivos são relacionados à adesão bacteriana às células do hospedeiro (FIGURA 5).



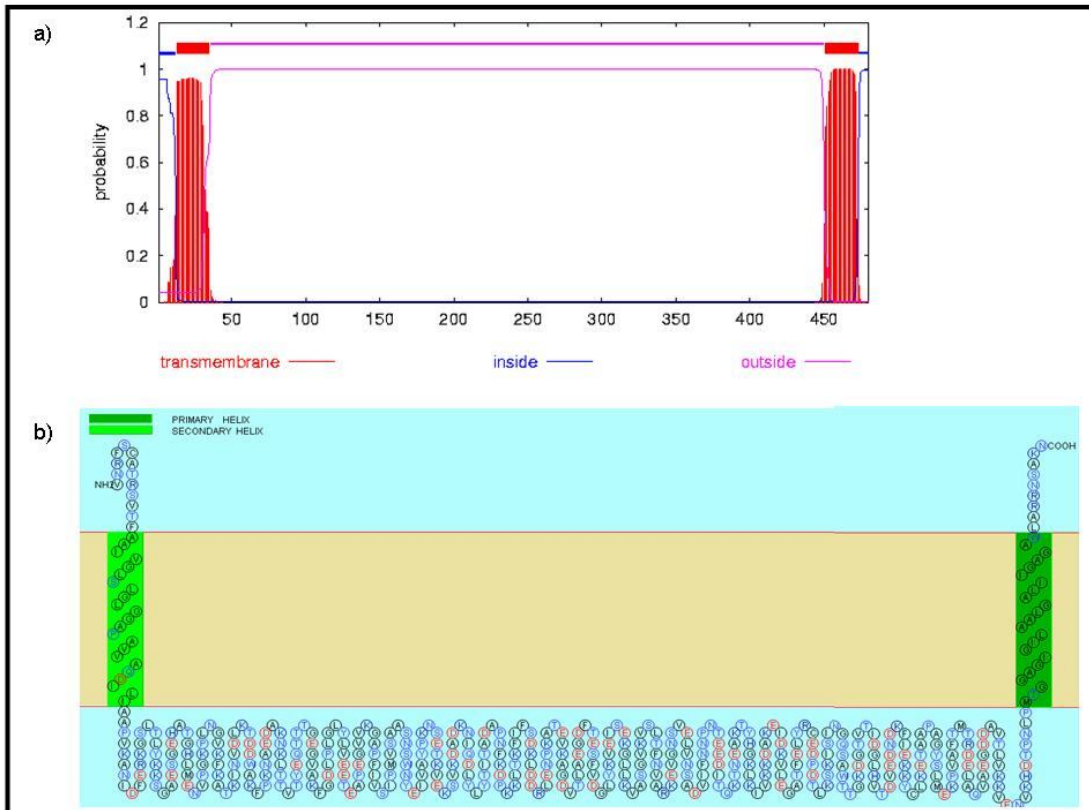
**FIGURA 5: Resultado da análise de domínios conservados realizadas pelo programa InterProScan.** A análise revelou a existência de dois possíveis domínios relacionados à adesão bacteriana às células do hospedeiro.

A busca por peptídeo sinal revelou a presença de um motivo de 31 resíduos de aminoácidos com um sítio de clivagem entre os resíduos Ala31 e Gln32. Estes resultados estão apresentados na FIGURA 6.



**FIGURA 6: Predição do peptídeo sinal da seqüência do mutante CP09 interrompida pelo transposon usando o programa SignalP 3.0.** A seta e o quadro correspondem ao provável sítio de clivagem do peptídeo sinal entre os resíduos Ala31 e Gln32.

Duas hélices transmembrânicas, uma primária compreendida entre os resíduos Met449 e Trp471 e uma secundária entre Ala14 e Ile36, foram previstas por ambos os programas empregados (FIGURA 7). A hélice secundária coincide com a região do peptídeo sinal identificada anteriormente neste tópico. O ponto isoelétrico da proteína foi de 5,48 e o peso molecular da mesma em sua forma madura é de 51,9 kDa.



**FIGURA 7: Predição de motivos transmembrânicos na seqüência do mutante CP09.** a) Análise do perfil de hidropatia usando o programa TMHMM. As regiões entre os aminoácidos 13-35 e 451-473 exibem alta hidrofobicidade. b) Duas hélices transmembrânicas hipotéticas entre os aminoácidos 449-471 e 14 e 36, identificadas utilizando o programa SOSUI.

Os resultados obtidos aqui sugerem que a proteína ausente no mutante CP09, uma provável subunidade fimbrial, é uma proteína exportada (secretada ou ancorada à membrana) e que participa de importantes processos bacterianos como a adesão e colonização do hospedeiro.



### 2.2.2. O mutante CP13

Os resultados promissores apresentados após a imunização dos camundongos com CP13 também nos levaram à busca pela seqüência codificadora do gene interrompido neste mutante. Através da análise por similaridade de seqüência, realizada no programa Artemis, contra a seqüência genômica de *C. pseudotuberculosis* (RGMG) obteve-se a seqüência nucleotídica completa de 906 nucleotídeos do gene interrompido no mutante de *C. pseudotuberculosis* CP13. A seqüência obtida está mostrada na FIGURA 8. Os nucleotídeos assinalados com um asterisco representam o ponto de inserção do transposon que interrompeu a seqüência deste gene, 512 (T) e 513 (G).

```
>CP13
1   ATGCAAAGCAAACCTAATTTTTTGGAGTATGCCTTGGCGGAATGTTCTGTTGCTGGATTC 60
61  ATAGCAATGATGGCTATTGTGGCCCTGATCTTGGGCGGATGCTCTACGACCAACAGCACG 120
121 AATTCCGCAGGAGAAGGTTCTAAAGAAGCACAAACAGGCTTCGGCAAAGCGGGTTGTTGCG 180
181 TTGGACTGGCGGTACGAGGAAATCCTTTATGCTCTTGGGGTACAACCTGTGGGGATAGTG 240
241 GAAATAGGTAAGTCAAAAAGAACCCCAAACCTCTTAAAGGAAAATTGGGTGACGCCACCTCT 300
301 GTAGGCCAAGCTAAGCAGCCAAATCTAGAGGTGATCCAATCCCTCGAACCTGACCTTATT 360
361 CTTGCTAGCCCTACACGCCAAGCAGGGATTATGGAGCAGCTAAAAAACATTGCCCCACA 420
421 GAGGCATATCAAGATAACAGTTATGTTGATGTCCTTGACTCAATGGATAGTATTGCGAAA 480
481 ATTCTAGGAAAAGAAGATAAAGCAGCGGAGGT*GCGAAGCCGCATAGAATCTAAAATCGGA540
541 ACGGCTAAAAACAAAGTAGCGCTCGGTACCCGGACTGCCCTTGATCGGATGGTCCAAAAAT 600
601 ACACTGTATACCTGGGTGAAAGATTCTTTCCCTGGGTCACTATTAACGGCCGTAGGATAC 660
661 GATTATGGTTTTGACGGGCAAAAATCAGCGATTGAGTCCAAGACAGACGTAGCAGAATTG 720
721 ACCGGTGACAAATTGCCTGGAATGAAGCTTGATGTGCATGTATCTGTACAACGCATCGAG 780
781 GGATTCCGCGCCAGCCCCATGCGGGGGTGTTCATAAGATCGTGAATGTTGAACAGGAT 840
841 ACGTGGTTCGCGGTTCGCGAGGCCCACTGGCAGCAGAAGCAATGCTGGATCAGATTATTAGC 900
901 TCTTAG 906
```

**FIGURA 8: Seqüência nucleotídica do gene interrompido no mutante CP13.** A seqüência consiste de 906 nucleotídeos em cujos nucleotídeos sublinhados houve a inserção do transposon TnFuZ. O asterisco marca exatamente a posição da inserção, entre os nucleotídeos 512 e 513.

O gene interrompido no mutante CP13 apresentou alta similaridade com uma provável proteína secretada ligada ao sistema de transporte de ferro de *C. diphtheriae gravis*. As análises nucleotídicas revelaram um E-value de 2e-128, um Score de 518 e 74% de identidade de seqüência, e as análises protéicas mostraram um E-value de 4e-117, um Score de 1091 e 76% de identidade (FIGURA 9).

```

a) Blastn
>|BX248355.1| C|Dynebacterium diphtheriae gravis NCTC13129, complete genome;
segment 2/8
Length=341553

Features in this part of subject sequence:
  Putative iron transport system binding (secreted) protein

Score = 468 bits (518), Expect = 2e-128
Identities = 546/737 (74%), Gaps = 0/737 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 169      CGGGTTGTTGCGTTGGACTGGCGGTACGAGGAAATCCTTTATGCTCTTGGGTACAACCT 228
                || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
Sbjct 202100   CGCGTCGTGGCCTTGGACTGGCGCTATGAGGAAATCCTTCATGCATTAGGTATCACCCCA 202159

b) Blastx
>|F|NP_938958.1| p|G|putative iron transport system binding (secreted) protein [Corynebacterium
diphtheriae NCTC 13129]
  emb|CAE49099.1| G|putative iron transport system binding (secreted) protein [Corynebacterium
diphtheriae]
Length=298

GENE ID: 2649656 DIP0582 | putative iron transport system binding (secreted)
protein [Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129] (10 or fewer PubMed links)

Score = 424 bits (1091), Expect = 4e-117
Identities = 221/288 (76%), Positives = 244/288 (84%), Gaps = 4/288 (1%)
Frame = +1

Query 40      NVLFAGFIAMMAIVALILGGCSTTNSTNSAGEGSKEAQQASAKRVVALDWRYEEILYALG 219
                + LFA +A++ +V L L GCS+ S + E K+ S+ RVVALDWRYEEIL+ALG
Sbjct 15      SALFAA-LALVLVVTLTLAGCSSDKSGETTAEAKKDP---SSIRVVALDWRYEEILHALG 70

```

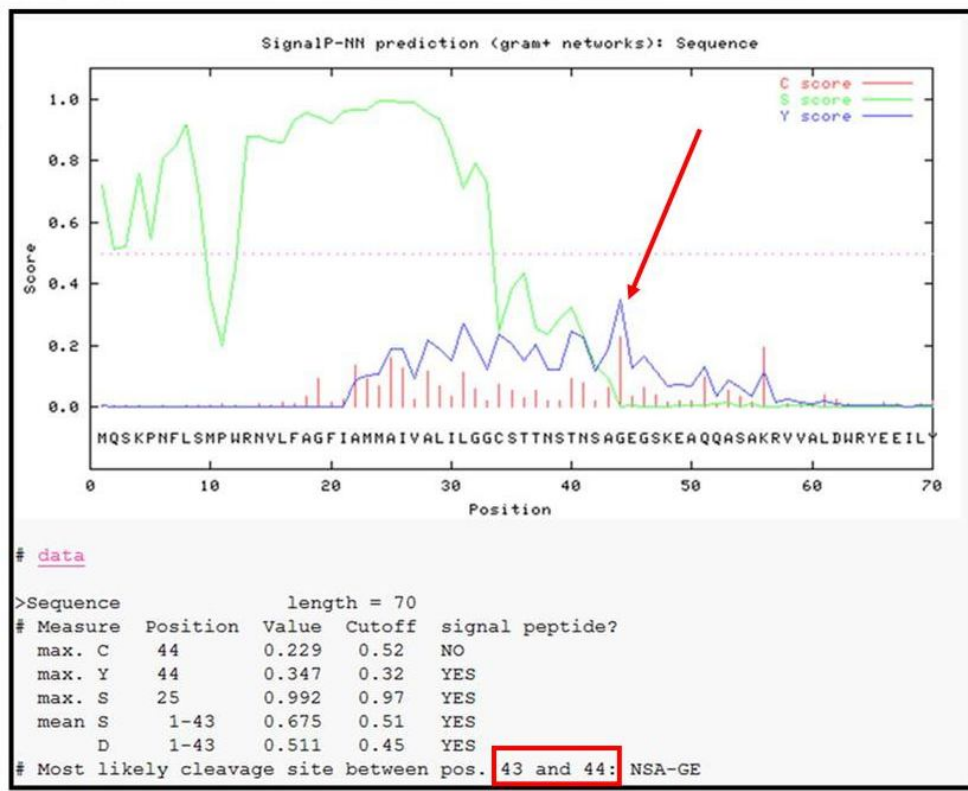
**FIGURA 9: Resultados das análises de similaridade nucleotídica e protéica obtida por Blastn e Blastx.** Ambas as análises revelaram que o gene interrompido pelo transposon no mutante CP13 codifica uma provável proteína (secretada) ligada ao sistema de transporte de ferro encontrada em *C. diphtheriae gravis*. A figura mostra apenas a parte inicial do alinhamento das seqüências.

A procura por motivos conservados, realizada no InterProScan, revelou a possível existência de um sítio de ligação de ferro-enxofre (2Fe-2S ferredoxina). A principal característica de proteínas que possuem este sítio é mediar a transferência de elétrons em várias reações metabólicas da bactéria (FIGURA 10).

InterPro IPR006058	2Fe-2S ferredoxin, iron-sulphur binding site		
Binding site	PROSITE	PS00197	2FE2S_FER_1 NA [311-319]? NA [537-545]?
InterPro SRS	PROSITE	PS00197	2FE2S_FER_1 NA [311-319]? NA [537-545]?
Parent	no parent		
Children	no children		
Found in	IPR001041 IPR004489 IPR006057 IPR011884 IPR012175 IPR012675 IPR014307 IPR014313 IPR016208 IPR017611 IPR017697		
Contains	no entries		
GO terms	Biological Process: electron transport (GO:0006118) Molecular Function: electron carrier activity (GO:0009055)		

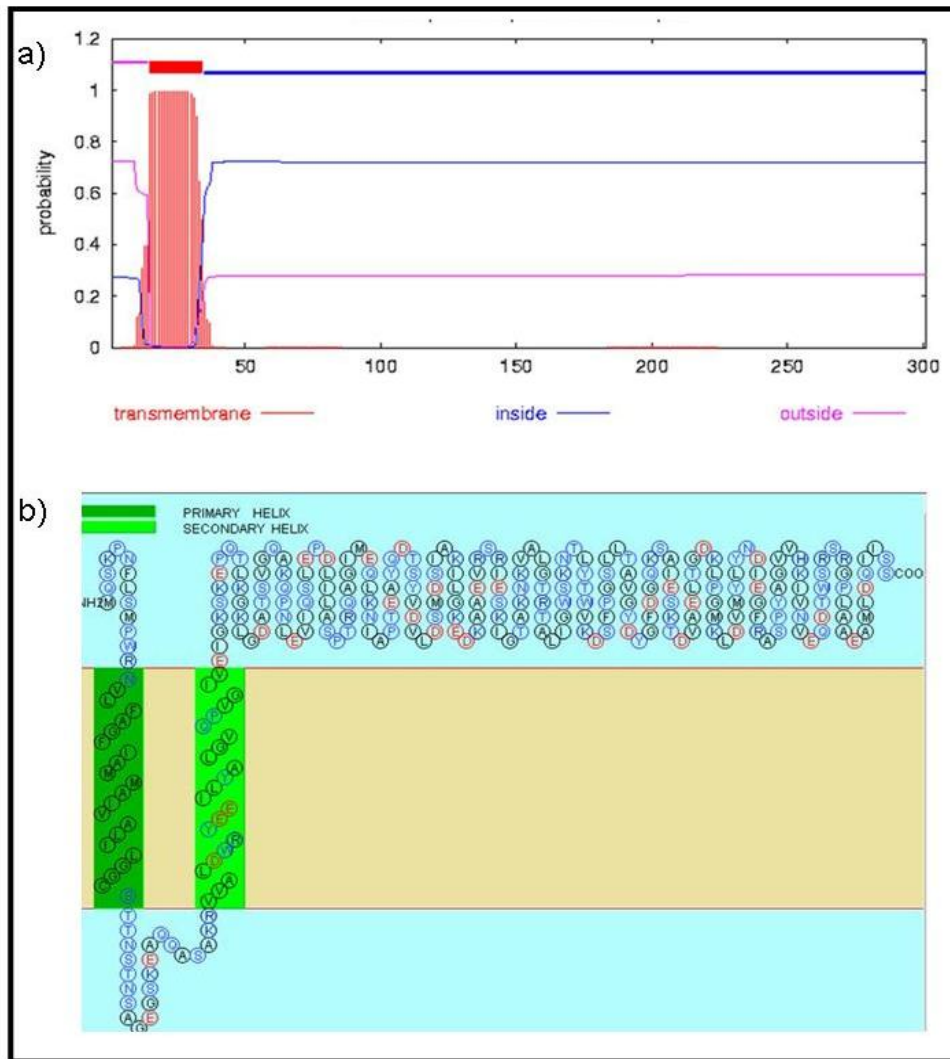
**FIGURA 10: Resultado da análise de domínios conservados realizadas pelo programa InterProScan.** A análise revelou a existência de um possível sítio de ligação ferro enxofre.

Foi também verificada a presença de um peptídeo sinal, composto de 43 resíduos de aminoácidos com um sítio de clivagem entre os resíduos Ala43 e Gly44 (FIGURA 11).



**FIGURA 11: Predição do peptídeo sinal da seqüência do mutante CP13 interrompida pelo transposon usando o programa SignalP 3.0.** A seta e o quadro correspondem ao provável sítio de clivagem do peptídeo sinal entre os resíduos Ala43 e Gly44.

Duas hélices transmembrânicas, uma primária compreendida entre os resíduos Asn14 – Ser35, também revelada pelo programa TMHMM, e uma secundária entre Val58 – Val80 foram identificadas (FIGURA 12). Acreditamos que a hélice primária, identificada pelos dois programas empregados, se refira ao peptídeo sinal presente na proteína. O ponto isoelétrico e o peso molecular da proteína em sua forma madura foram 5,46 e 32,6 kDa, respectivamente.



**FIGURA 12: Predição de motivos transmembrânicos na seqüência do mutante CP13.** a) Análise do perfil de hidropatia usando o programa TMHMM. A região entre os aminoácidos 15 e 34 exibe alta hidrofobicidade. b) Duas hélices transmembrânicas hipotéticas entre os aminoácidos 14-35 e 58-80 foram identificadas a partir do programa SOSUI.

Os resultados obtidos mostram que o gene interrompido no mutante CP13 codifica uma proteína exportada, relacionada ao sistema de transporte de ferro, que pode ser bastante importante na biologia e principalmente na sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* dentro das células do hospedeiro.

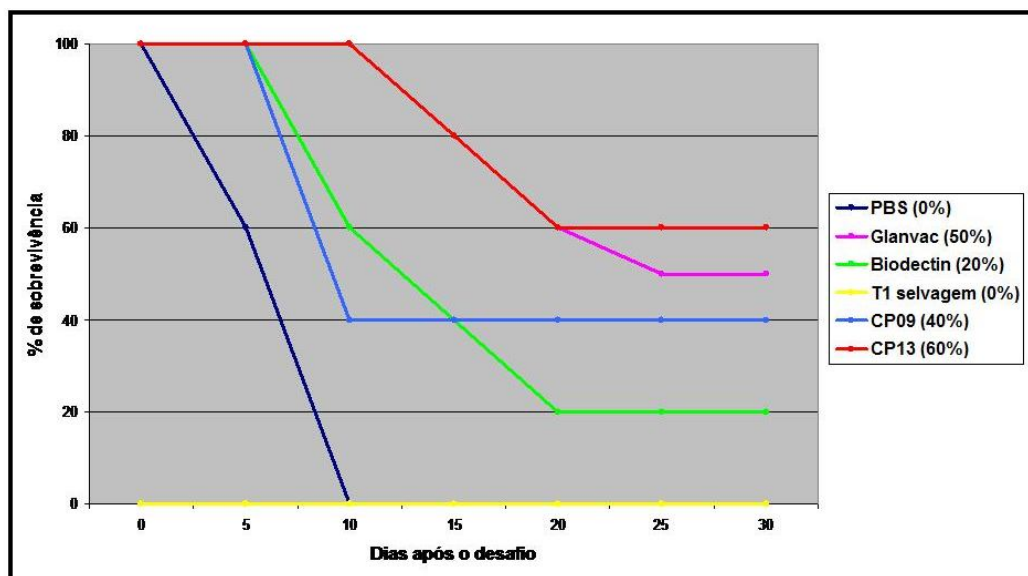
### **2.3. Ensaio final de imunização em camundongos utilizando as linhagens recombinantes selecionadas**

Uma vez selecionados os mutantes CP09 e CP13, que apresentaram maior potencial de proteção em camundongos, partiu-se para os experimentos finais de imunização a fim de avaliarmos, além da taxa de sobrevivência dos camundongos após o desafio, o perfil de produção de imunoglobulinas e citocinas induzido nos animais imunizados.

Sendo assim, seguindo-se o cronograma de imunizações anteriormente proposto, duas semanas após a imunização dos grupos de 10 animais com os mutantes e após a revacinação dos animais com as vacinas comerciais, foi realizado o desafio dos camundongos com a bactéria selvagem. Os grupos testados neste ensaio foram:

- a. grupo controle negativo vacinado com PBS;
- b. grupo controle positivo vacinado com Glanvac™3 (toxóide de *C. pseudotuberculosis* combinada a antígenos clostridianos);
- c. grupo controle positivo vacinado com Biodectin® (toxóide de *C. pseudotuberculosis* combinada a antígenos clostridianos);
- d. grupo controle negativo vacinado com a linhagem T1 selvagem;
- e. grupo teste vacinado com a linhagem recombinante CP09;
- f. grupo teste vacinado com a linhagem recombinante CP13.

Na FIGURA 13 está representado o gráfico da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com os mutantes selecionados desde o dia do desafio até 30 dias após o mesmo. Nestes ensaios, os 10 camundongos pertencentes a cada grupo foram acompanhados a cada cinco dias e os óbitos contabilizados.



**FIGURA 13: Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes selecionadas.** Os dados mostram o resultado de um experimento representativo, utilizando 10 camundongos por grupo, no qual a sobrevivência foi acompanhada até 30 dias após o desafio. Os valores finais da porcentagem de sobrevivência para cada grupo estão apresentados entre parênteses na legenda.

Analisando-se o gráfico e comparando os resultados nele representados com aqueles anteriormente mostrados nas FIGURAS 1 e 2 podemos observar que CP13 manteve os maiores índices de proteção, levando a 60% de sobrevivência dos animais desafiados. A vacina Biodectin® manteve o mesmo índice de proteção em todos os experimentos, em torno de 20%. O mesmo ocorreu com a vacina Glanvac™3 alcançando 50% de proteção. A vacinação com CP09 resultou em 40% de proteção dos animais vacinados, um pouco abaixo daquela obtida nos ensaios anteriores, nos quais alcançou quase 60% de proteção.

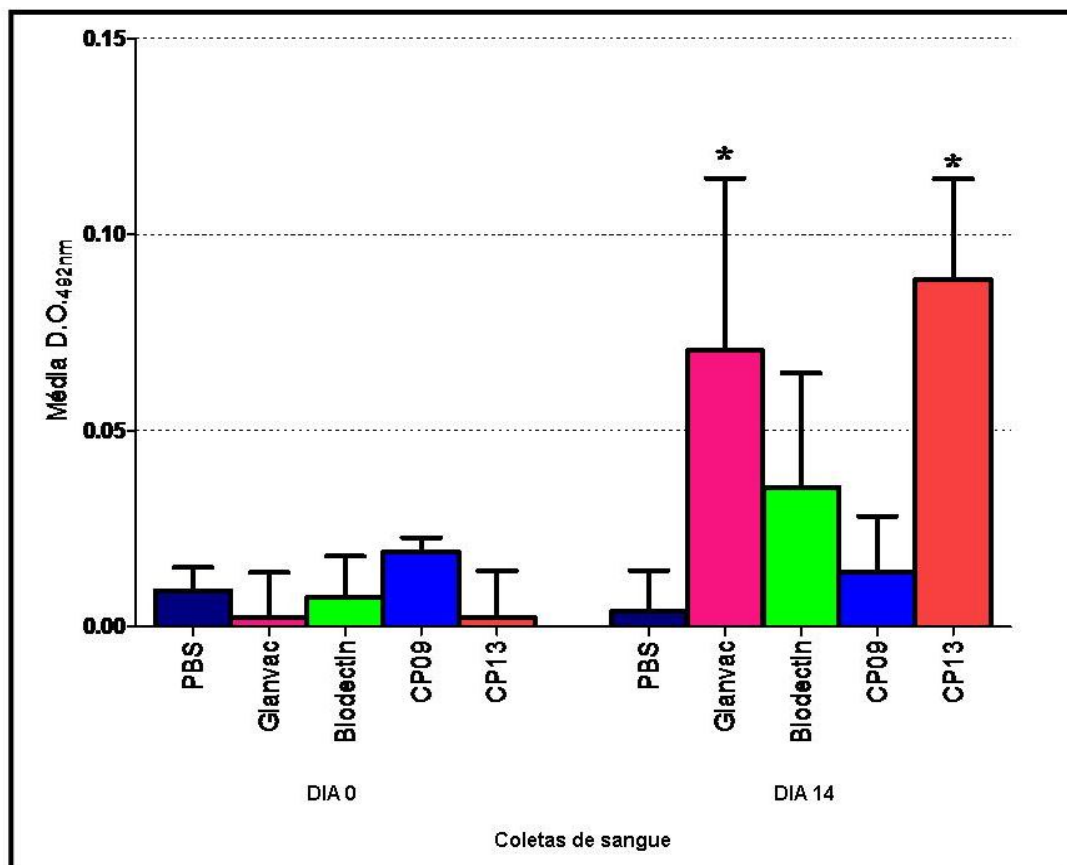
Tendo em vista os resultados obtidos em todos os testes de imunização, a vacinação baseada no mutante CP13 de *C. pseudotuberculosis* mostrou ser a mais promissora quanto ao seu uso potencial como vacina, no que diz respeito tanto à reprodutibilidade dos resultados quanto ao nível de proteção dos animais contra o desafio com a linhagem virulenta.

#### **2.4. Análise da produção de imunoglobulinas induzidas pela imunização com as linhagens recombinantes selecionadas**

Com o objetivo de verificar a produção de anticorpos IgG específicos, os soros dos animais imunizados com os mutantes CP09 e CP13 foram testados por ELISA. A produção

das subclasses IgG1 e IgG2a também foi analisada com o intuito de se determinar o padrão de resposta imune, Th1 ou Th2, gerado.

A FIGURA 14 mostra os resultados obtidos no ensaio de ELISA para a análise da produção de IgG.

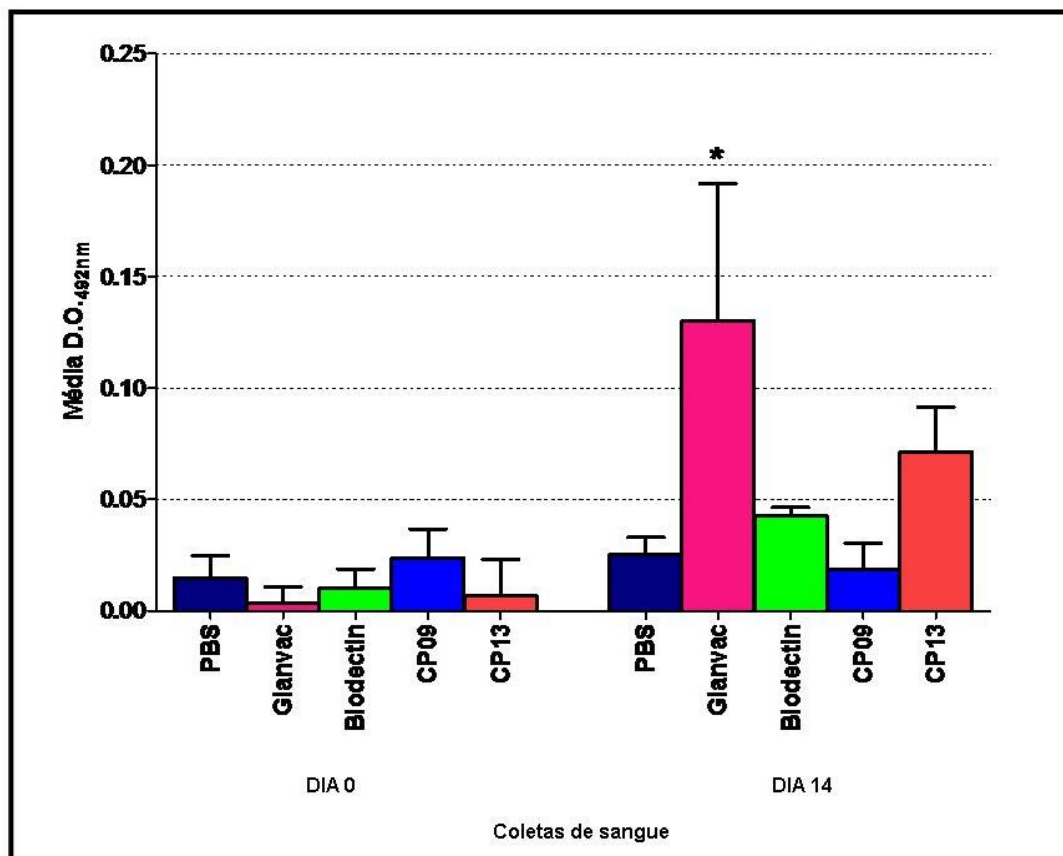


**FIGURA 14: Representação gráfica da produção de IgG específico pelos camundongos imunizados com as linhagens mutantes CP09 e CP13.** Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0) e 14 dias após a imunização com as respectivas linhagens e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos. \*Significativos em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0.05$ ).

Os resultados obtidos mostram que os camundongos imunizados com o mutante CP13 desenvolveram altos níveis de anticorpos IgG quando comparados aos produzidos pelo grupo controle PBS. Níveis semelhantes e também significativos foram observados pelos animais imunizados com a vacina Glanvac™3. Nos animais imunizados com a vacina Biodectin® houve um aumento nos níveis de IgG após a imunização, no entanto, este

resultado não foi significativo. O mesmo não foi observado nos animais imunizados com CP09, cuja produção de IgG praticamente não se alterou.

A imunização com as linhagens mutantes também induziu a produção de IgG1 (FIGURA 15) em todos os camundongos imunizados.

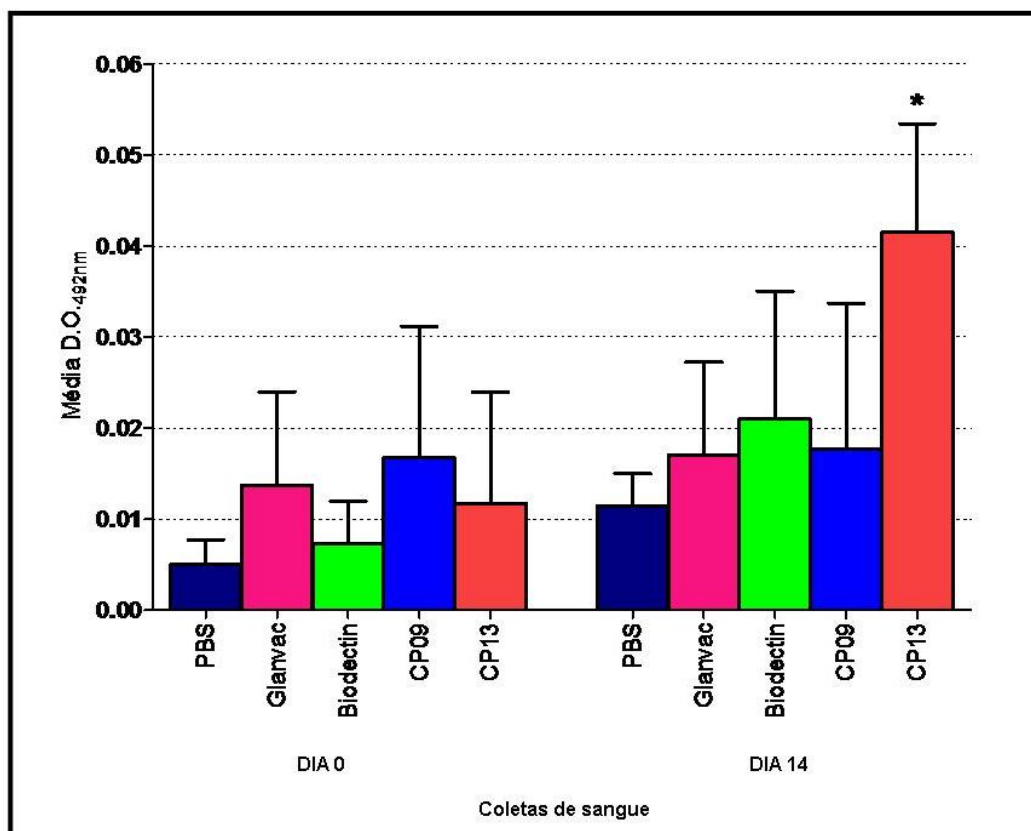


**FIGURA 15: Reprodução gráfica dos níveis de IgG1 produzidos após imunização com as linhagens mutantes.** Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0) e 14 dias após a imunização e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos. \*Significativo em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0,05$ ).

Analisando-se os resultados mostrados no gráfico tem-se que quanto à produção de IgG1, o grupo vacinado com Glanvac™3 apresentou índices significativamente altos de indução em relação ao grupo PBS. O grupo vacinado com CP13 mostrou um aumento na produção desta imunoglobulina, no entanto este não foi significativo. A vacinação com Biodectin® levou a um discreto aumento nos níveis da imunoglobulina e a imunização com CP09 não demonstrou induzir níveis detectáveis da subclasse analisada.



Em relação aos níveis de IgG2a induzidos após as imunizações (FIGURA 16) tem-se que a vacinação com CP13 induziu níveis bastante significativos dessa imunoglobulina em relação ao grupo PBS. Houve também um aumento discreto nos níveis de IgG2a produzidos pelos outros grupos testados, exceto CP09, que novamente mostrou não induzir a produção desta subclasse de imunoglobulina.



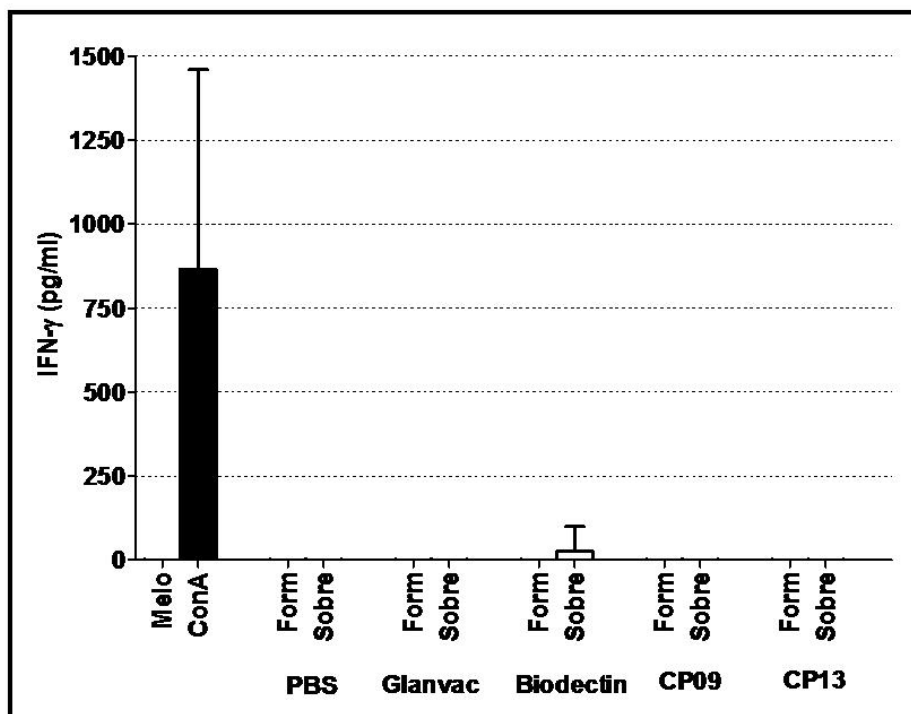
**FIGURA 16:** Representação gráfica dos níveis de IgG2a produzidos após imunização com as linhagens mutantes. Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0) e 14 dias após a imunização e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos.\*Significativo em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0,05$ ).

### 2.5. Caracterização do perfil de resposta imune celular induzido pela imunização dos camundongos com as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis*

A resposta imune celular induzida após a vacinação dos animais com as linhagens recombinantes foi avaliada a partir de ensaios de ELISA utilizando o sobrenadante das

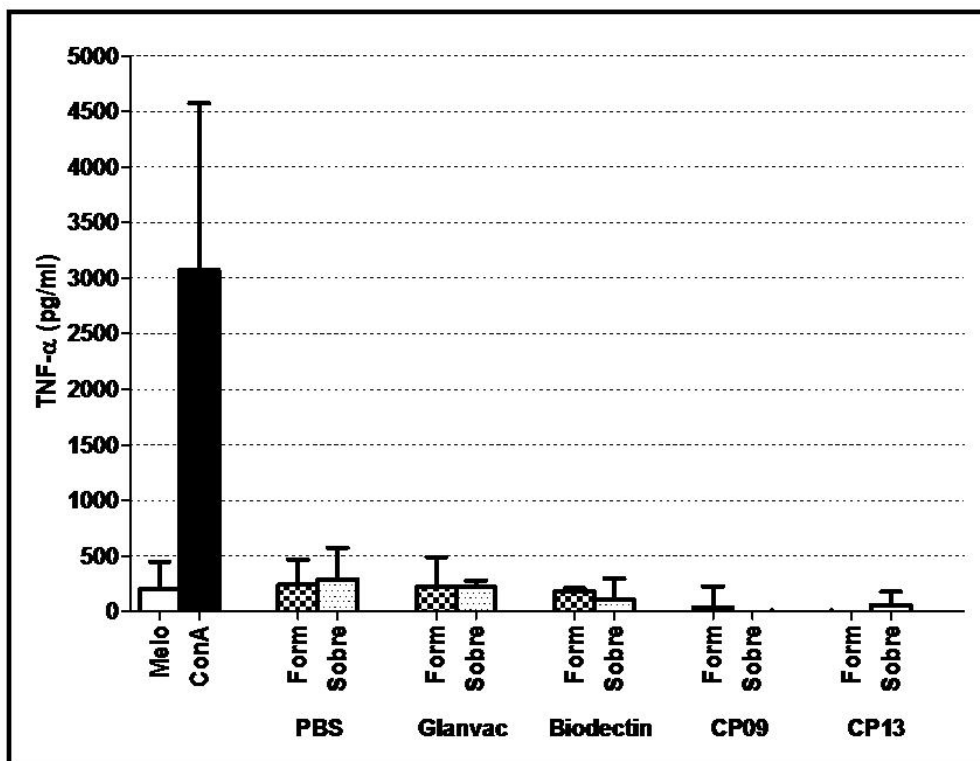
culturas de esplenócitos dos camundongos imunizados. Foram mensuradas as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10. Tais citocinas estão envolvidas no direcionamento da resposta imune para Th1 ou Th2, como INF- $\gamma$  e IL-4, respectivamente. A produção de TNF- $\alpha$  leva a uma reação inflamatória e posterior indução da migração de macrófagos e IL-10 é responsável por inibir tal processo (Kaplan *et al.*, 2002).

A FIGURA 17 mostra os resultados da produção de IFN- $\gamma$  pelos animais imunizados com as linhagens recombinantes. Como pode ser observado pela análise dos resultados não houve produção significativa de IFN- $\gamma$  no ensaio realizado.



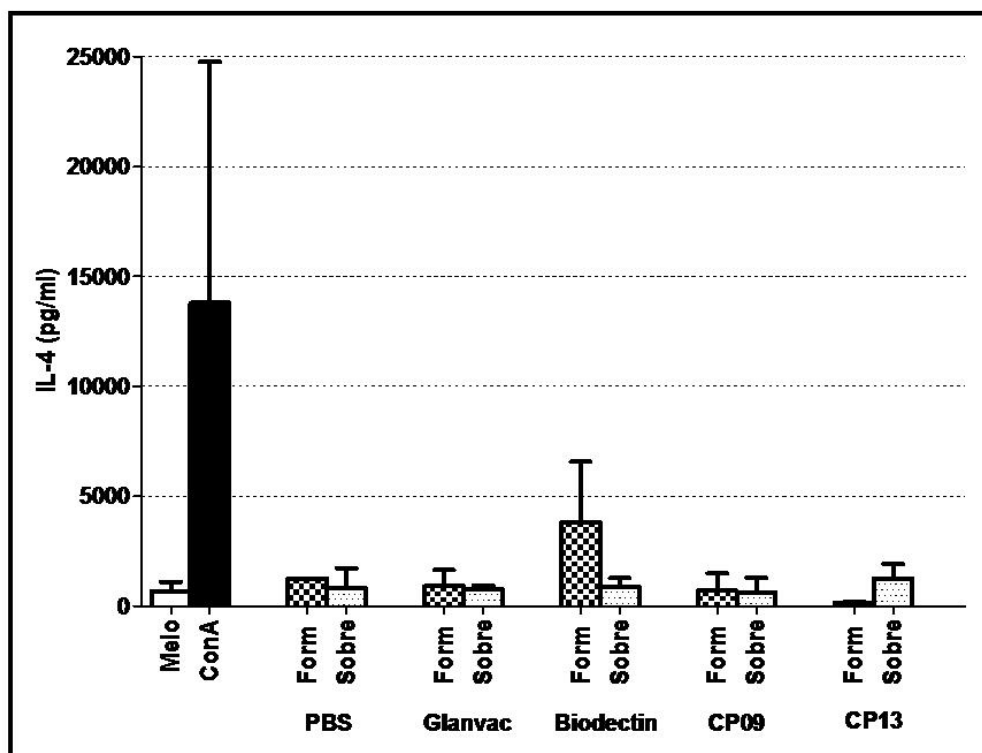
**FIGURA 17:** Representação gráfica da produção de IFN- $\gamma$  induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

Na FIGURA 18 estão apresentados os resultados da produção de TNF- $\alpha$  pelas células esplênicas dos animais imunizados. Os níveis induzidos desta citocina não foram significativos, uma vez que os níveis observados foram praticamente os mesmos produzidos pelo controle negativo estimulado somente com meio de cultura.



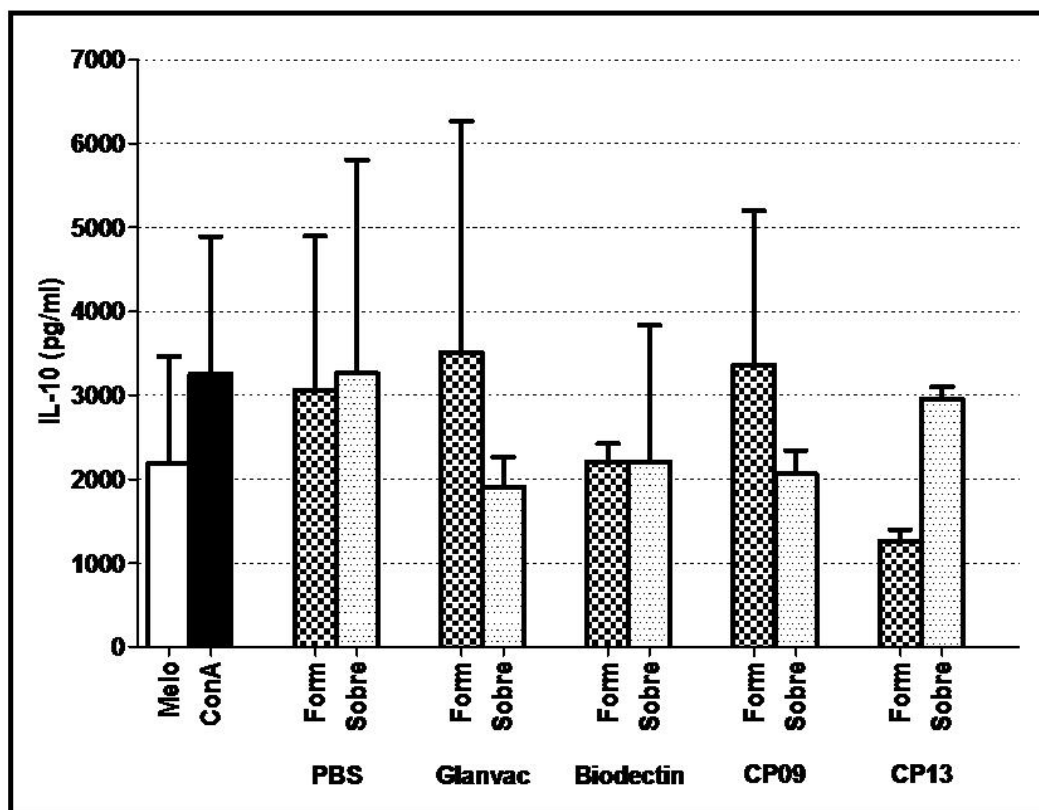
**FIGURA 18:** Representação gráfica da produção de TNF- $\alpha$  induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

A produção de IL-4 também foi avaliada e encontra-se no gráfico da FIGURA 19. A indução de IL-4 não foi significativa em nenhum dos grupos analisados. Houve um discreto aumento nos níveis desta citocina pelo grupo imunizado com Biodectin®, no entanto, esta produção não foi significativa em relação ao grupo controle, estimulado somente com meio de cultura.



**FIGURA 19:** Representação gráfica da produção de IL-4 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

Em relação à produção de IL-10, mostrada no gráfico da FIGURA 20, níveis mais elevados desta citocina foram observados para ambos os estímulos, no entanto, estes níveis não foram significativos em relação àqueles produzidos pelos controles.

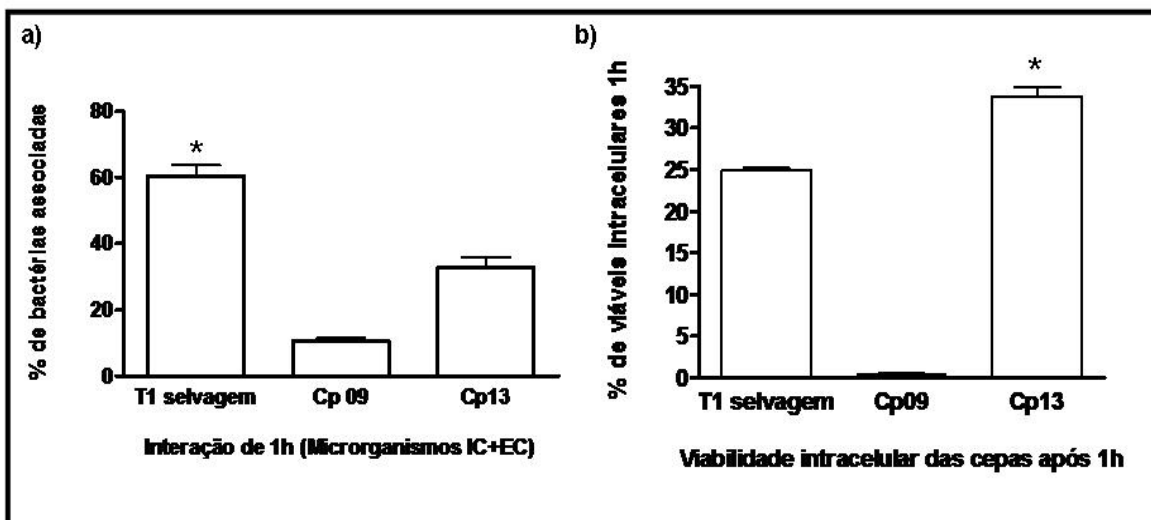


**FIGURA 20:** Representação gráfica da produção de IL-10 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

## 2.6. Ensaios de interação dos mutantes CP09 e CP13 com células J774

A linhagem CP13 selecionada nos ensaios de imunização foi submetida a análises do padrão de aderência às monocamadas de células murinas quando comparados com aqueles apresentados pela linhagem T1 selvagem. A linhagem CP09, embora não tenha apresentado resultados satisfatórios nos ensaios de imunização, também foi testada.

As análises de aderência e viabilidade foram realizadas em intervalos de um, três e seis horas após o contato das células bacterianas com as monocamadas. Os resultados após uma hora de interação estão apresentados na FIGURA 21 e TABELA 2.



**FIGURA 21:** Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após uma hora de interação com as monocamadas de células J774. Resultados são expressos como a média e o desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata. \*Significativo em relação aos demais grupos testados ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 2:** Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após uma hora de interação.

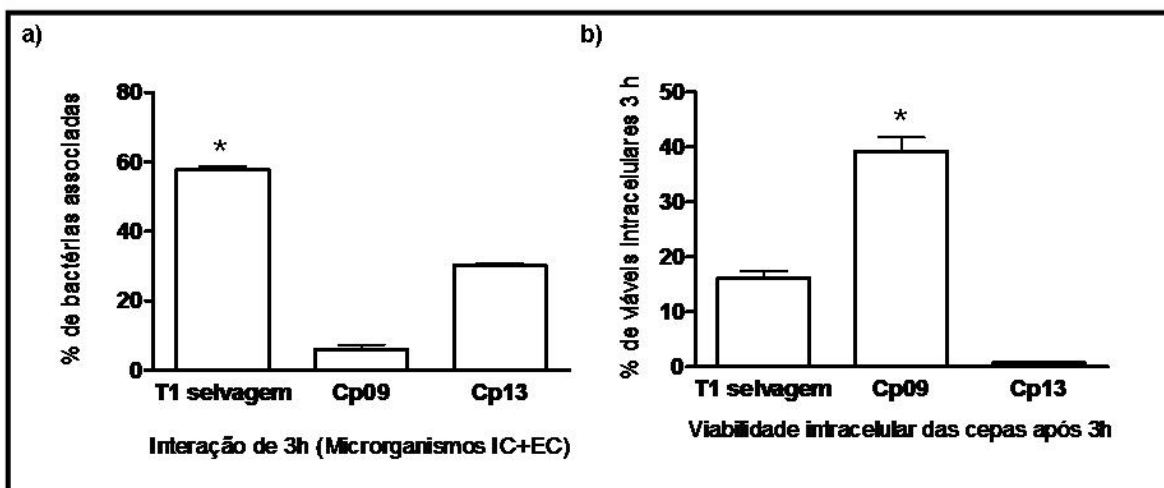
Linhas	% de viáveis associadas (IC+EC)	% de viáveis IC
T1 selvagem	60.48 % ± 3.192	24.88 % ± 0.3683
CP09	10.71 % ± 0.8627	0.4850 % ± 0.08451
CP13	32.92 % ± 3.071	33.83 % ± 1.062

EC - microrganismos aderidos (viáveis extracelulares).

IC - microrganismos viáveis intracelulares.

Após a análise dos resultados após uma hora de interação pode-se perceber que ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as linhagens CP09 e CP13 quando comparadas à linhagem T1 selvagem. A linhagem CP13 apresentou maior taxa de aderência e viabilidade que a linhagem CP09. Após uma hora de interação, os mutantes CP13 aderidos penetraram no interior das células e apresentaram o maior e mais significativo percentual de células viáveis dentre todas as linhagens analisadas.

Os resultados do padrão de interação das linhagens após três horas estão apresentados na FIGURA 22 e TABELA 3.



**FIGURA 22:** Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após três horas de interação com as monocamadas de células J774. Resultados são expressos como a média e o desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata. \*Significativo em relação aos demais grupos testados ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 3:** Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após três horas de interação.

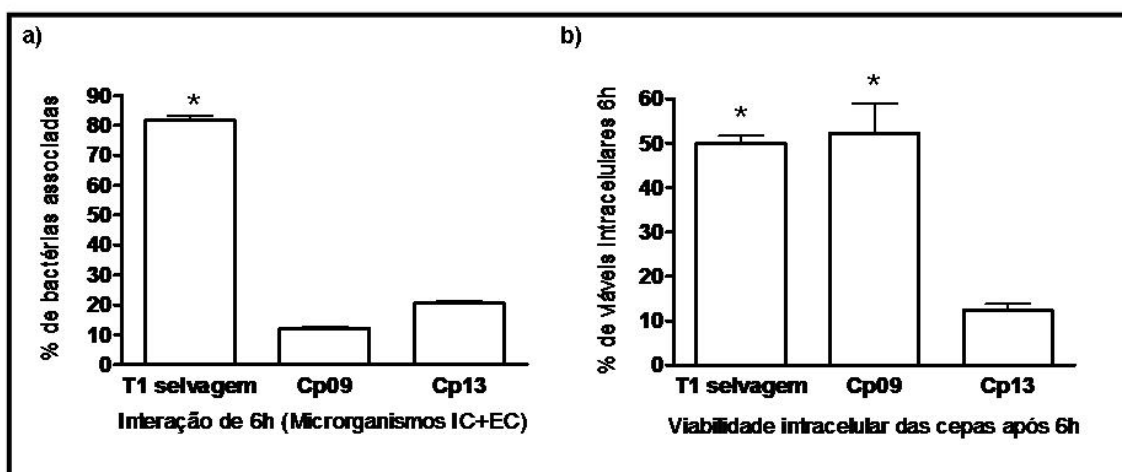
Linhas	% de viáveis associadas (IC+EC)	% de viáveis IC
T1 selvagem	57.86 % ± 0.7150	16.19 % ± 1.271
CP09	5.923 % ± 1.363	39.29 % ± 2.438
CP13	30.14 % ± 0.7247	0.7450 % ± 0.03571

EC - microrganismos aderidos (viáveis extracelulares).

IC - microrganismos viáveis intracelulares.

Os resultados obtidos após três horas de interação das linhagens bacterianas com as monocamadas de células J774 revelaram que a linhagem CP13 apresentou os menores percentuais de células viáveis intracelulares, apesar de esta linhagem ter apresentado o maior percentual de bactérias viáveis intracelulares após uma hora. Este resultado sugere que a linhagem CP13 é a mais facilmente eliminada por fagocitose e/ou incapacidade do mutante em sobreviver dentro da célula hospedeira. Embora seja menos capaz de se aderir às monocamadas, o mutante CP09 apresentou uma viabilidade intracelular bastante significativa em relação ao mutante CP13.

Os dados abaixo correspondem às comparações entre as diferentes linhagens após interação por seis horas com as monocamadas de células (FIGURA 23 e TABELA 4).



**FIGURA 23:** Representação gráfica dos a) padrões de associação e b) viabilidade intracelular das linhagens CP09, CP13 e T1 selvagem após seis horas de interação com as monocamadas de células J774. Resultados são expressos como a média e o desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata. \*Significativo em relação aos demais grupos testados ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 4:** Média + desvio padrão dos percentuais de bactérias associadas às monocamadas de células J774 (viáveis intracelulares + extracelulares) e viáveis intracelulares, após seis horas de interação.

Linhagens	% de viáveis associadas (IC+EC)	% de viáveis IC
T1 selvagem	81.61 % ± 1.774	49.81 % ± 1.804
Cepa 09	11.96 % ± 0.6102	52.24 % ± 6.619
Cepa 13	20.56 % ± 0.5450	12.35 % ± 1.550

EC - microrganismos aderidos (viáveis extracelulares).

IC - microrganismos viáveis intracelulares.

Análise dos microrganismos viáveis intracelulares, após seis horas de interação com as monocamadas de células J774, revelou que a linhagem que apresentou o menor índice de viabilidade intracelular permaneceu sendo a linhagem CP13, sugerindo que o mutante é o mais facilmente eliminado através do processo de fagocitose ou, ainda, sugerindo que este mutante não seja capaz de sobreviver dentro da célula devido à mutação sofrida. Os percentuais de viáveis intracelulares de CP13 são significativamente menores quando comparados com as outras linhagens, CP09 e T1. Não houve diferença quando analisados os percentuais de viáveis intracelulares das linhagens CP09 e T1 entre si.



### 3. Discussão

Vacinas vivas atenuadas são produzidas a partir da atenuação da virulência, isto é, do potencial causador de doença do microorganismo (Silva *et al.*, 2004). Esta atenuação pode ocorrer de forma natural ou através de manipulação, temperatura, agentes químicos, genética (recombinante). Neste tipo de estratégia vacinal o microorganismo mantém sua capacidade de replicação, mimetizando a infecção natural e produzindo ambas as respostas, humoral e celular. Além disso, é o tipo de vacina que confere melhor e mais prolongada resposta imunológica devido a sua similaridade à infecção natural, sendo que isso é alcançado com somente uma dose (Dorella *et al.*, 2008). Embora este tipo de vacina seja predominante no mercado, atualmente sua eficácia e segurança são bastante contestadas, bem como a questão ética na utilização de organismos vivos, mesmo que atenuados como vacinas (Schatzmayr, 2003; Movahedi & Hampson, 2008). Essas questões de biossegurança constituem importante plataforma de trabalho para o desenvolvimento de vacinas vivas mais seguras (Dougan, 1994; Foss & Murtaugh, 2000). Para contornar estes problemas, hoje em dia são empregadas técnicas moleculares que permitem torná-las seguras, diminuindo a virulência do patógeno e evitando que haja reversão. Entre essas técnicas, a deleção de múltiplos genes relacionados à virulência, ou mesmo inserções de fragmentos que interrompam tais genes no patógeno, quase que eliminam por completo o risco de que o patógeno reverta à sua forma virulenta (Jiskoot *et al.*, 2002; Schatzmayr, 2003).

Tentativas de se obter uma vacina viva atenuada eficiente foram testadas desde o início das buscas por uma vacina contra a LC (Pépin *et al.*, 1993; Hodgson *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998). Descrições de linhagens de *C. pseudotuberculosis* naturalmente atenuadas e testadas como possíveis vacinas são raras de se obter. Um destes relatos diz respeito à linhagem 1002 desta bactéria, derivada de um isolado naturalmente de baixa virulência em 1971 (EBDA). No entanto, apesar de ter apresentado 83% de proteção em caprinos em testes experimentais, esta vacina não vem fornecendo os mesmos índices em campo.

Uma alternativa bastante utilizada são as vacinas vivas atenuadas em laboratório (recombinantes). Estas, preferencialmente, têm o gene da *pld* como alvo para tal atenuação por causa da sua importância como fator de virulência (Carne & Onon, 1978). O papel da PLD na virulência da bactéria ficou evidente após a geração de mutantes *pld*. Estes são incapazes de se disseminar e, além disso, induzem uma resposta imunológica protetora, embora não satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992). No entanto, a importância da PLD vai além da infecção. A ausência desta proteína, como evidenciada em estudos utilizando mutantes cujo gene *pld* foi deletado, é importante também para conferir

proteção. A falta deste fator fez com que a linhagem mutante não estimulasse suficientemente o sistema imunológico do hospedeiro com uma única dose e foi capaz de proteger o hospedeiro somente em 50% dos casos (Hodgson *et al.*, 1994). Sendo assim, a geração de diferentes mutantes, como *recA*, que não levou à redução da virulência da bactéria (Pogson *et al.*, 1996) e *aroQ*, cujo mutante é altamente atenuado (Simmons *et al.*, 1997 e 1998), tem sido encorajada, já que dependendo do tipo de atenuação, pode-se afetar a imunogenicidade da linhagem, ou seja, a sua capacidade de induzir proteção.

Sendo assim, neste trabalho foram testadas, quanto à atenuação, capacidade de induzir resposta imune e, conseqüentemente, como potenciais vacinas vivas atenuadas, as linhagens recombinantes de *C. pseudotuberculosis* obtidas anteriormente por nosso grupo (Dorella *et al.*, 2006b).

Testes iniciais de imunização em camundongos destacaram as linhagens recombinantes CP09, que possui interrupção em um gene que codifica uma subunidade fimbrial, e CP13, cujo gene interrompido codifica uma proteína do sistema de transporte de ferro, como as que levaram a um maior índice de proteção dos animais contra a infecção com a linhagem selvagem, 60% e 80%, respectivamente. Estes resultados iniciais nos incentivaram a testar todos os diferentes mutantes obtidos, num total de 21, em novos ensaios de imunização. Novamente, os mutantes que mais se destacaram, levando a uma proteção de 57% e 81%, foram CP09 e CP13, respectivamente. Estes mutantes garantiram aos animais imunizados uma alta porcentagem de sobrevivência, mais alta até que aquelas oferecidas pelas vacinas comerciais testadas, Glanvac™3 e Biodectin®. Desta forma partimos para os testes finais de imunização em camundongos utilizando os dois mutantes selecionados, CP09 e CP13, que incluíam, além de novas imunizações, análises da produção de imunoglobulinas e citocinas e ensaios de interação dos mutantes com células de murinos.

Os resultados de proteção obtidos mostraram que as linhagens recombinantes, CP09 e CP13, ofereceram aos animais 40% e 60% de sobrevivência respectivamente. Destacamos, então, a linhagem CP13 como a que forneceu, em todos os ensaios de imunização, os mais altos índices de proteção aos animais imunizados, superando novamente os valores de proteção oferecidos pelas vacinas comerciais. Além disso, não foram observadas reações adversas locais ou sistêmicas demonstrando assim sua atenuação e segurança em comparação aos resultados observados com a linhagem T1 selvagem.

A produção de IgG total revelou que o mutante CP13 induziu altos e significativos índices desta imunoglobulina nos camundongos imunizados. Já as análises de IgG1 revelaram que não houve produção significativa desta imunoglobulina por nenhum dos mutantes. Os índices de produção de IgG2a foram bem mais significativos naqueles animais

imunizados com o mutante CP13. A produção de IgG2a, em camundongos, é característica do tipo de resposta imune Th1, responsável pela eliminação de patógenos intracelulares como *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1994), sugerindo assim, que o tipo de resposta induzida por CP13 condiz com aquela esperada no combate à bactéria.

As análises da produção de citocinas não foram esclarecedoras, uma vez que nenhum dos grupos avaliados mostrou induzir resposta celular. Muitos estudos têm demonstrado a importância deste tipo de resposta contra *C. pseudotuberculosis* (Pépin *et al.*, 1997; Hodgson *et al.*, 1999). Patógenos intracelulares facultativos como *C. pseudotuberculosis* são, geralmente, combatidos pela ação fagocitária de macrófagos, tipo de imunidade celular anti-bacteriana dependente de células Th1. Para que estes sejam ativados é necessária a ação de IFN- $\gamma$ , que os torna aptos a combater o microrganismo fagocitado. Esta citocina também tem relação direta com a síntese de IgG2a em camundongos que, via ativação do sistema do complemento, também aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos. Além disso, os macrófagos, mesmo antes da participação efetiva do sistema imune, podem iniciar processos inflamatórios através da síntese de outras citocinas como TNF- $\alpha$  (Nakane *et al.*, 1991; Denis *et al.*, 1991). Por outro lado, as citocinas IL-4, que ativa linfócitos B e a conversão para Th2, e IL-10, que age inibindo a ação dos macrófagos, são características do tipo de resposta Th2, antagonista a Th1, e útil contra patógenos extracelulares (Mowat & Rweyemamu, 1997). Estudos sobre o perfil de citocinas expressas durante a infecção experimental permitem a correlação com as observações da proporção da subpopulação de linfócitos presentes no granuloma (Pépin *et al.* 1994). De acordo com Pépin e colaboradores (1997), diversas citocinas são expressas durante a infecção, entre as quais se destacam a produção de IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes e de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  no sítio de inoculação. De acordo com Jolly (1965) a resolução da infecção por *C. pseudotuberculosis* está relacionada com a presença de macrófagos ativados dentro da lesão. O papel do INF- $\gamma$  durante a infecção também foi ressaltado em ovinos desafiados experimentalmente (Hodgson *et al.*, 1992) e em caprinos infectados naturalmente (Regis, 2001).

Deste modo, os resultados obtidos nos ensaios de citocinas são contrários aos esperados, uma vez que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , possuem papel importante na proteção do hospedeiro frente à infecção com *C. pseudotuberculosis* (Simmons *et al.*, 1997; Lan *et al.*, 1999). Além disso, como houve proteção no grupo de camundongos vacinados com CP13 e produção significativa de IgG2a, era esperada a indução do perfil Th1 de resposta, caracterizado aqui pela produção principalmente de IFN- $\gamma$ .

Não podemos desconsiderar o fato da análise tardia na produção das citocinas, isso porque, resultados controversos também foram obtidos por Simmons e colaboradores (1997). Quando avaliada a produção de IFN- $\gamma$  no sétimo e décimo quarto dias após a

vacinação de camundongos com linhagens mutantes de *C. pseudotuberculosis* verificou-se que a produção desta citocina passava de qualitativamente detectável (dia 7) a totalmente indetectável no dia 14, sugerindo um perfil de infecção auto-limitante. Como não foi analisado o perfil de produção de citocinas ao sétimo dia após a imunização no presente trabalho, não se pode afirmar que tais citocinas não foram produzidas. A produção de IL-10, mesmo que baixa, quando comparada à ausência na produção de IFN- $\gamma$ , sugere também um perfil imunomodulatório que pode ter contribuído para a inibição da produção de IFN- $\gamma$  em nossos experimentos (Shaw *et al.*, 2000). Isso pode ter ocorrido devido a uma resposta do organismo devido a uma reação inflamatória intensa que ocasionou a mudança de resposta de Th1 para Th2, sendo a última detectada nos ensaios de ELISA. E ainda, Paule e colaboradores (2003) também verificaram, em experimentos de imunização em caprinos, que alguns animais aparentemente não produziam IFN- $\gamma$  após a imunização, em contrapartida, os mesmos apresentaram proteção significativa contra o desafio.

Análises mais acuradas deverão ser consideradas uma vez que o mecanismo que levou à resposta protetora oferecida por CP13 não foi totalmente elucidado. Embora significativas, as produções de imunoglobulinas foram baixas. Talvez 14 dias após a imunização seja um tempo curto para a avaliação da real indução de imunidade humoral. A avaliação de IgM específica pode ser uma alternativa mais representativa da imunidade humoral neste período de tempo. O mesmo pode ser considerado para as análises de citocinas. Um novo regime de coleta de esplenócitos (ao sétimo e décimo quarto dias após a vacinação), uma mudança nos estímulos utilizados e um aumento no período que antecede o desafio, ao serem adotados, poderão esclarecer tais resultados.

Apesar de não ter sido confirmado o perfil de resposta imune condizente com os níveis de proteção observados, a linhagem CP13 mostrou ser bastante promissora como candidata a uma vacina alternativa no combate à LC, em modelo murino. E, contrastando com todos esses resultados, o mutante CP09 não levou a qualquer indução na produção de imunoglobulinas ou citocinas, embora tenha se destacado nos índices de proteção a que levou os animais com ele imunizados.

Tentando relacionar a mutação sofrida por esses mutantes com a virulência e sua capacidade de proteger os camundongos também foram realizadas diversas análises *in vitro* e *in silico*. Resultados dos estudos do padrão de aderência revelaram que o mutante CP13 apresentou uma diminuição significativa na capacidade de se aderir às células murinas não tão pronunciada quanto à observada no mutante CP09, mas bem menor que aquela observada na linhagem T1 selvagem. A proteína ausente no mutante CP09 é similar a uma subunidade fimbrial de *C. diphtheriae* também presente em *Actinomyces viscosus*. Segundo os dados do UniProtKb, esta proteína está envolvida na adesão bacteriana à superfície celular do hospedeiro, participando do processo de colonização do mesmo. A ausência

desta proteína pode então ter contribuído para a enorme redução na capacidade deste mutante em aderir-se às células murinas.

Os resultados de viabilidade intracelular do mutante CP13 às células J774 de camundongos revelaram que embora CP13 tenha apresentado altos índices de viabilidade intracelular após uma hora de interação com as monocamadas, esta linhagem apresentou os mais baixos índices de sobrevivência dentro das células do hospedeiro, ou seja, o mutante foi mais facilmente eliminado pelo processo de fagocitose ou por morte celular que a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis*. A proteína ausente no mutante CP13 é similar à proteína FecB de *Escherichia coli*, a qual pertence à família de proteínas ligadoras de soluto bacterianas e está envolvida no transporte de ferro a partir de citrato férrico. Em geral, proteínas relacionadas ao transporte de ferro são bastante utilizadas por bactérias patogênicas para “perceber” condições limitantes de ferro do hospedeiro e como um sinal ambiental para induzir a expressão de fatores de virulência. Além disso, o ferro modula a adesão bacteriana às células do hospedeiro e aumenta a capacidade da bactéria em desenvolver uma infecção persistente (Billington *et al.*, 2002). Dados do UniProtKB revelaram ainda que esta proteína pode estar relacionada a processos biológicos como a transferência direcionada, para dentro, para fora ou entre células, de íons ferro (mesmo em baixas concentrações) com alta afinidade, caracterizando-a como parte de um sideróforo.

Os dados aqui obtidos correlacionados com os resultados de proteção fornecidos por CP13 sugerem que este mutante possua uma habilidade reduzida em sobreviver dentro da célula do hospedeiro devido à deficiência em captar ferro neste ambiente “hostil”. Uma vez que a aquisição de ferro é essencial para o crescimento da bactéria *in vivo*, a inabilidade de CP13 em captá-lo pode ser considerada uma atenuação importante do ponto de vista imunológico. Isso porque o mutante parece ser capaz de invadir as células do hospedeiro, no entanto, devido à sua inabilidade em captar ferro do meio, não é capaz de sobreviver por muito tempo e, conseqüentemente, não se dissemina e desencadeia a doença. Contudo é reconhecido pelo sistema imune, fato este evidenciado pela produção significativa de IgG e IgG2a, o que leva, de modo ainda não elucidado, à proteção contra o desafio.

## Estratégia II - Desenvolvimento de uma vacina inativada contra *C. pseudotuberculosis* em modelo murino

### 1. Material e Métodos

#### 1.1. Linhagens de *C. pseudotuberculosis* e condições de cultivo

Nesta estratégia foram utilizadas as quatro linhagens selvagens de *C. pseudotuberculosis* apresentadas na TABELA 5 abaixo. As linhagens foram cultivadas em meio “Brain Heart Infusion” (BHI) suplementado com 0,5% de Tween 80, a 37°C por 72 horas, sob agitação. Para as culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foram adicionados ao meio de cultura.

**TABELA 5: Linhagens selvagens de *C. pseudotuberculosis* utilizadas neste trabalho.**

Linhagens	Características	Referência
T1	Linhagem selvagem, isolada de caprino no território brasileiro.	Dr. Roberto Meyer Universidade Federal da Bahia
1002	Linhagem naturalmente atenuada, isolada de caprino no território brasileiro.	Dr. Roberto Meyer Universidade Federal da Bahia
MIC-6	Linhagem selvagem recém-isolada de caprino no território brasileiro, altamente virulenta.	LGCM
HJ ULCC06.334.4	Linhagem selvagem isolada de caprino.	Dr. Mario Vanechoutte University Hospital, Ghent Bélgica

#### 1.2. Inativação das linhagens selvagens de *C. pseudotuberculosis*

Após o período de crescimento, em meio apropriado por 72 horas, sob agitação, foram adicionados 3% de formalina (Formaldeído a 37%; Eggleton *et al.*, 1991) às culturas e estas foram então incubadas em estufa a 37°C e agitadas a cada 3-4 horas por um período de aproximadamente 18 horas (Alves & Olander, 1998). Após esse período, uma alíquota de 100µl foi retirada de cada cultura e plaqueada em meio sólido para verificar a eficiência da inativação, ou seja, a ausência de crescimento bacteriano (24-48 horas). Durante este período, a suspensão bacteriana permaneceu estocada em geladeira (4°C).

### **1.3. Formulação das vacinas bacterianas inativadas**

Uma vez confirmada a inativação por meio da verificação de ausência de crescimento bacteriano, foi realizada a formulação das vacinas da seguinte forma:

- a. Concentração de células bacterianas -  $10^8$  unidades formadoras de colônia/ml (UFC/ml; Eggleton *et al.*, 1991);
- b. Hidróxido de alumínio - 12% (Cameron & Bester, 1984);
- c. Salina estéril q.s.p. - volume desejado de vacina.

Após a formulação da vacina o pH foi corrigido para 7,2-7,4 com HCl ou NaOH, de acordo com a necessidade. A adsorção foi feita após a formulação e correção do pH, em geladeira, por 12 horas, agitando-se a formulação a cada dois horas. As vacinas foram então aliquotadas em um volume de 2 ml e armazenadas a 4°C até sua utilização.

### **1.4. Modelo animal**

Foram empregados nos ensaios de imunização camundongos BALB/c com idades entre seis a oito semanas, susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Por razões éticas, todos os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical quando moribundos.

### **1.5. Ensaios de imunização**

O cronograma de imunizações seguido nesta estratégia foi estabelecido a partir de ensaios-piloto onde foram definidos: o volume das culturas a serem inoculados nos animais; via de inoculação mais adequada para este tipo de vacinação e os intervalos entre as imunizações. Num dia 0, grupos de camundongos foram imunizados, cada um, com uma vacina comercial, Glanvac™3 ou Biodectin e com as quatro linhagens inativadas. Quatro semanas depois, no dia 28, esses mesmos grupos de camundongos receberam uma segunda dose das mesmas formulações (revacinação). Quatorze dias após o segundo período de imunização (dia 42) todos os animais foram desafiados com a linhagem selvagem virulenta MC-6.

Nos ensaios de imunização iniciais foram formados grupos de cinco camundongos e testadas as linhagens selvagens descritas na TABELA 5, apropriadamente inativadas. Um grupo vacinado com PBS (controle negativo), um grupo imunizado com a vacina Glanvac™3

(controle positivo; Pfizer Animal Health, Austrália) e um grupo imunizado com a vacina Biodectin® (controle positivo; Fort Dodge, Brasil) também fizeram parte dos experimentos. Os animais foram imunizados por administração subcutânea de 100µl (vacinas inativadas e PBS) e 300µl (vacinas comerciais) das respectivas culturas, o que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC/ml para as linhagens inativadas de acordo com Eggleton e colaboradores (1991).

### **1.6. Desafio e determinação do nível de proteção**

Os animais imunizados foram desafiados pela via intraperitoneal com 10<sup>6</sup> UFC/ ml da linhagem virulenta MIC-6, de acordo com o cronograma proposto. A proteção conferida pelo processo de imunização nos camundongos foi avaliada de acordo com a taxa de sobrevivência dos animais imunizados com as linhagens inativadas de *C. pseudotuberculosis*, quando comparados àqueles imunizados somente com PBS. Esta avaliação deu-se num intervalo máximo de quatro semanas após o desafio, durante o qual os animais foram acompanhados diariamente e os óbitos contabilizados. Os camundongos que apresentaram sinais de morbidez, de médio a avançados, foram sacrificados por deslocamento cervical e também contabilizados como óbitos.

Após a conclusão dos ensaios de imunização descritos acima, foram selecionados os candidatos mais promissores, ou seja, aqueles que apresentaram os melhores níveis de proteção. A partir desta seleção, foram realizados novos experimentos, em maior escala, onde foram incluídas as análises imunológicas descritas nas próximas seções.

### **1.8. Coletas de sangue**

As coletas de sangue foram realizadas em intervalos de 14 dias contados a partir do primeiro dia de imunização sendo que houve uma coleta de sangue antes da primeira imunização. Os animais foram submetidos à coleta de sangue nos dias 0, 14, 28 e 42. O sangue foi coletado da veia do plexo retro-orbital com o auxílio de pipetas Pasteur. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e estocado a -20°C até a dosagem de anticorpos específicos por ELISA.

### **1.9. Detecção de imunoglobulinas a partir das amostras de soro dos animais imunizados – como descrito no tópico 1.7, Estratégia I**

### **1.10. Cultura de células esplênicas para dosagem de citocinas imunizados – como descrito no tópico 1.8, Estratégia I**



### **1.11. ELISA para detecção de citocinas**

Para a obtenção da medida dos níveis de citocinas local, foram utilizados os kits Duo Set ELISA Development System para as citocinas INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-4, adquiridos comercialmente (R&D Systems) e usados de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

### **1.12. Análises estatísticas**

Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$ ) desvio padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada utilizando-se o teste ANOVA, seguido do teste “Bonferroni”, ambos disponíveis no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Um valor de  $p < 0,05$  foi utilizado como limite da significância estatística.

## 2. Resultados

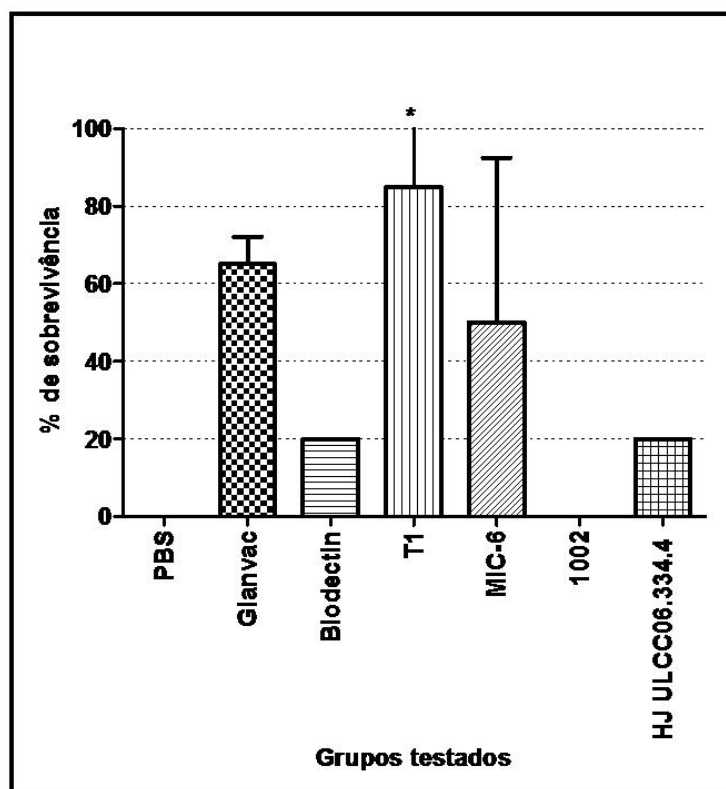
### 2.1. Imunização de camundongos com as linhagens selvagens inativadas de *C. pseudotuberculosis* e proteção contra o desafio com a linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*

Seguindo o cronograma de imunizações, camundongos vacinados com as linhagens inativadas foram revacinados quatro semanas após a primeira imunização. Duas semanas após o reforço, os animais foram desafiados com a linhagem selvagem virulenta MIC-6.

No período compreendido entre a primeira vacinação e o desafio foram observados alguns sintomas como prostração, surgimento de ferimento no local da inoculação da vacina (dorso do animal), principalmente após a vacinação com as linhagens 1002 e HJ ULCC06.334.4. Estes sintomas também foram observados nos camundongos imunizados com as vacinas comerciais Glanvac™3 e Biodectin®. Tais reações observadas nos camundongos foram transitórias e permaneceram visíveis por uma a três semanas não comprometendo o andamento do experimento.

Após o desafio, os animais foram acompanhados diariamente e ao longo de quatro semanas o número de animais que vieram a óbito foi contabilizado. A capacidade protetora das linhagens inativadas testadas foi considerada como a porcentagem de animais que sobreviveram ao desafio em relação aos animais do grupo não vacinado PBS (FIGURA 24).

A análise dos resultados mostrou que a linhagem selvagem inativada T1 de *C. pseudotuberculosis* forneceu o melhor resultado de proteção em relação ao grupo PBS, alcançando acima de 80% de sobrevivência dos animais imunizados com esta linhagem. Este resultado superou até mesmo a proteção oferecida pelas vacinas comerciais Glanvac™3 (aproximadamente 65%) e Biodectin® (20%). A linhagem MIC-6 não apresentou reprodutibilidade nos resultados obtidos nos dois ensaios de imunização. O mesmo resultado satisfatório não foi observado na imunização com as linhagens selvagens inativadas HJ ULC06.334.4 (20%) e, principalmente, com a linhagem 1002 que não foi capaz de oferecer qualquer proteção aos animais após o desafio.



**FIGURA 24:** Representação gráfica dos índices de proteção conferidos aos animais imunizados com as linhagens inativadas após o desafio com a linhagem selvagem. Os dados mostram a média e desvio padrão de dois experimentos representativos, utilizando cinco camundongos por grupo em cada experimento. \*significativo em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0,05$ ).

Tendo em vista o resultado obtido, a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, em sua forma inativada, foi selecionada para a próxima fase de testes de imunização em camundongos, que incluiu além de novos ensaios de proteção, análises de produção de imunoglobulinas e citocinas.

## 2.2. Ensaio final de imunização de camundongos com a linhagem selvagem inativada T1

Novamente, o cronograma foi seguido para os ensaios finais de imunização com a linhagem selvagem inativada T1. Sendo assim, duas semanas após a imunização dos grupos de 10 animais com a linhagem inativada e as vacinas comerciais e a revacinação dos mesmos foi realizado o desafio dos camundongos com a linhagem selvagem.

Vacinas, comerciais ou experimentais, utilizadas no combate à LC são, freqüentemente, baseadas em PLD, o principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*

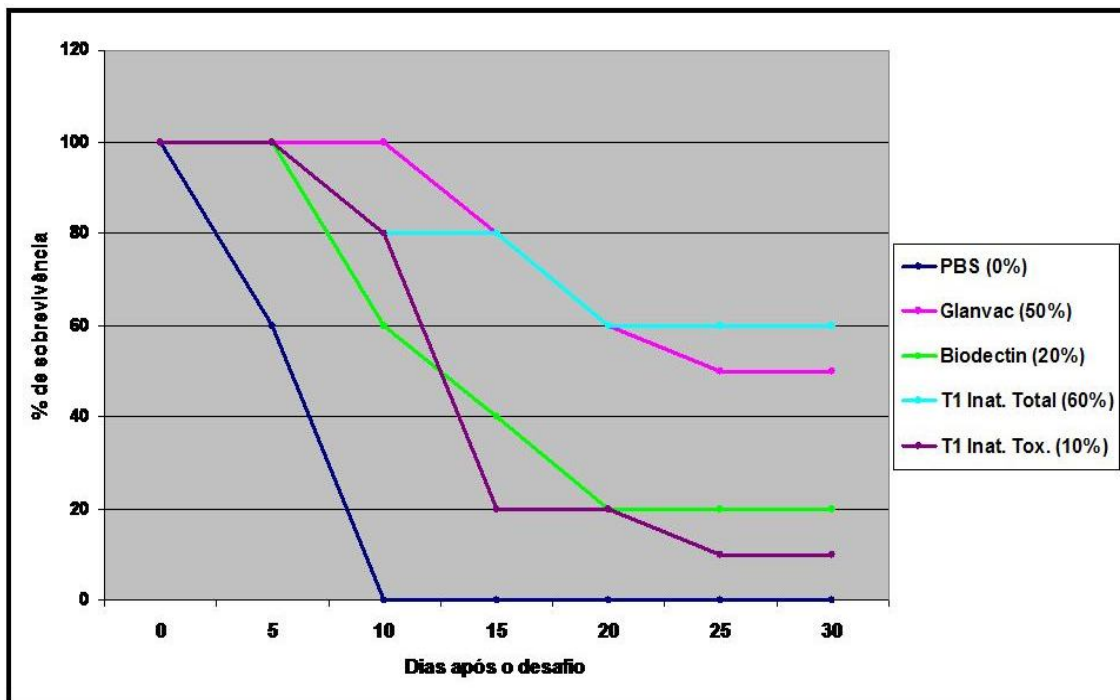
que está presente no sobrenadante da cultura da bactéria (Dorella *et al.*, 2006a e 2009). Outros componentes celulares também vêm sendo testados como bactérias inativadas com formalina e preparações com frações da parede celular (Tachedjian *et al.*, 1995; Baird & Fontaine, 2007). A fim de verificar se a utilização do sobrenadante da formulação da linhagem T1 inativada traria resultados mais satisfatórios que a utilização da formulação inativada total, a preparação da linhagem T1 inativada foi testada de duas formas: (i) formulação total como anteriormente empregada, constituída pela mistura dos antígenos somáticos (células bacterianas) e dos antígenos secretados (sobrenadante da cultura), denominada aqui T1 inativada Total e (ii) formulação contendo somente o sobrenadante da preparação anterior, denominada T1 inativada Tox, em referência à vacina de toxina inativada baseada em PLD (toxóide). Para esta última, formulação total foi centrifugada e o sobrenadante foi injetado no camundongo subcutaneamente. O mesmo cronograma foi seguido para as duas preparações bem como os mesmos volumes inoculados nos animais.

Deste modo, os grupos testados nos ensaios que se seguiram foram:

- a. grupo controle negativo vacinado com PBS;
- b. grupo controle positivo vacinado com Glanvac™3 (toxóide de *C. pseudotuberculosis* combinada a antígenos clostridianos);
- c. grupo controle positivo vacinado com Biodectin® (toxóide de *C. pseudotuberculosis* combinada a antígenos clostridianos);
- d. grupo teste vacinado com a formulação de T1 inativada Total;
- e. grupo teste vacinado com a formulação de T1 inativada Toxóide;

Na FIGURA 25 está representado o gráfico da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as preparações testadas desde o dia do desafio até 30 dias após o mesmo. Nestes ensaios, os 10 camundongos pertencentes a cada grupo foram acompanhados a cada cinco dias e os óbitos contabilizados.

Analisando-se o gráfico e comparando os resultados nele representados com o anteriormente mostrado nas FIGURAS 24 podemos observar que T1 inativada Total manteve o bom índice de proteção, alcançando 60% de sobrevivência dos animais imunizados. A vacina Biodectin® manteve o mesmo índice de proteção em todos os experimentos, em torno de 20%. O mesmo ocorreu com a vacina Glanvac™3 alcançando 50% de proteção. Ao se comparar os resultados obtidos pelas preparações, Total e Tox, da linhagem T1 inativada, pode-se perceber uma grande diferença entre as taxas de sobrevivência dos camundongos. Somente 10% dos camundongos vacinados com a formulação baseada no toxóide (Tox.) sobreviveram ao desafio, em contrapartida, 60% dos animais vacinados com a formulação Total resistiram ao desafio.



**FIGURA 25:** Representação gráfica da cinética de sobrevivência dos camundongos imunizados com as linhagens inativadas selecionadas. Os dados mostram o resultado de um experimento representativo, utilizando 10 camundongos por grupo, no qual a sobrevivência foi acompanhada até 30 dias após o desafio. Os valores finais da porcentagem de sobrevivência para cada grupo estão apresentados entre parênteses na legenda.

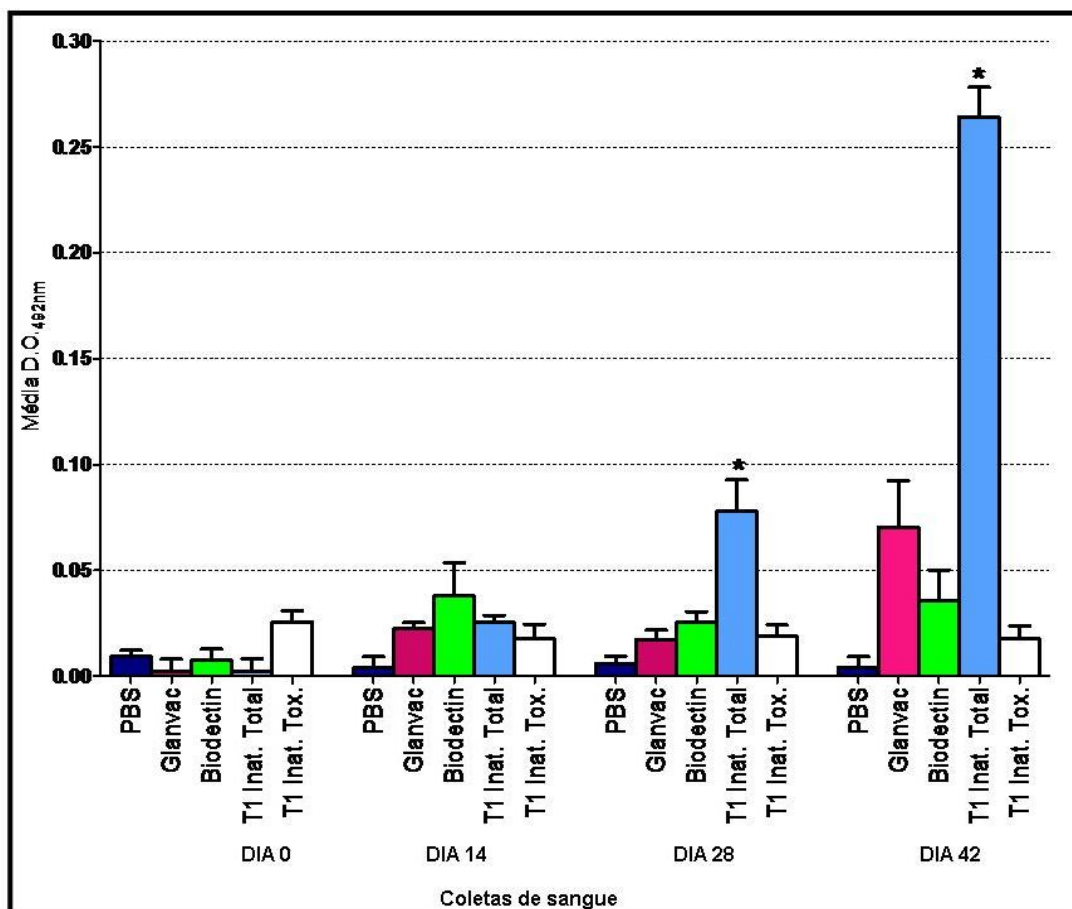
Com base neste resultado de proteção e no resultado anteriormente obtido, a formulação inativada Total da linhagem T1 mostrou ser uma candidata em potencial para ser utilizada como alternativa vacinal contra a LC.

### 2.3. Análise da produção de imunoglobulinas induzida pela imunização com as linhagens inativadas

O perfil de resposta humoral induzida nos animais imunizados pelas linhagens selvagens inativadas, representado pela avaliação da produção de anticorpos IgG específicos, bem como a produção das subclasses IgG1 e IgG2a, foi avaliado através do ensaio de ELISA.

Na FIGURA 26 estão representados os resultados obtidos nos ensaios de ELISA para a produção de IgG. Um aumento significativo nos níveis desta imunoglobulina, produzidos pela vacinação com T1 Total, foi observado quatro semanas após a vacinação, sendo que este aumento foi cerca de três vezes mais pronunciado após a revacinação (DIA

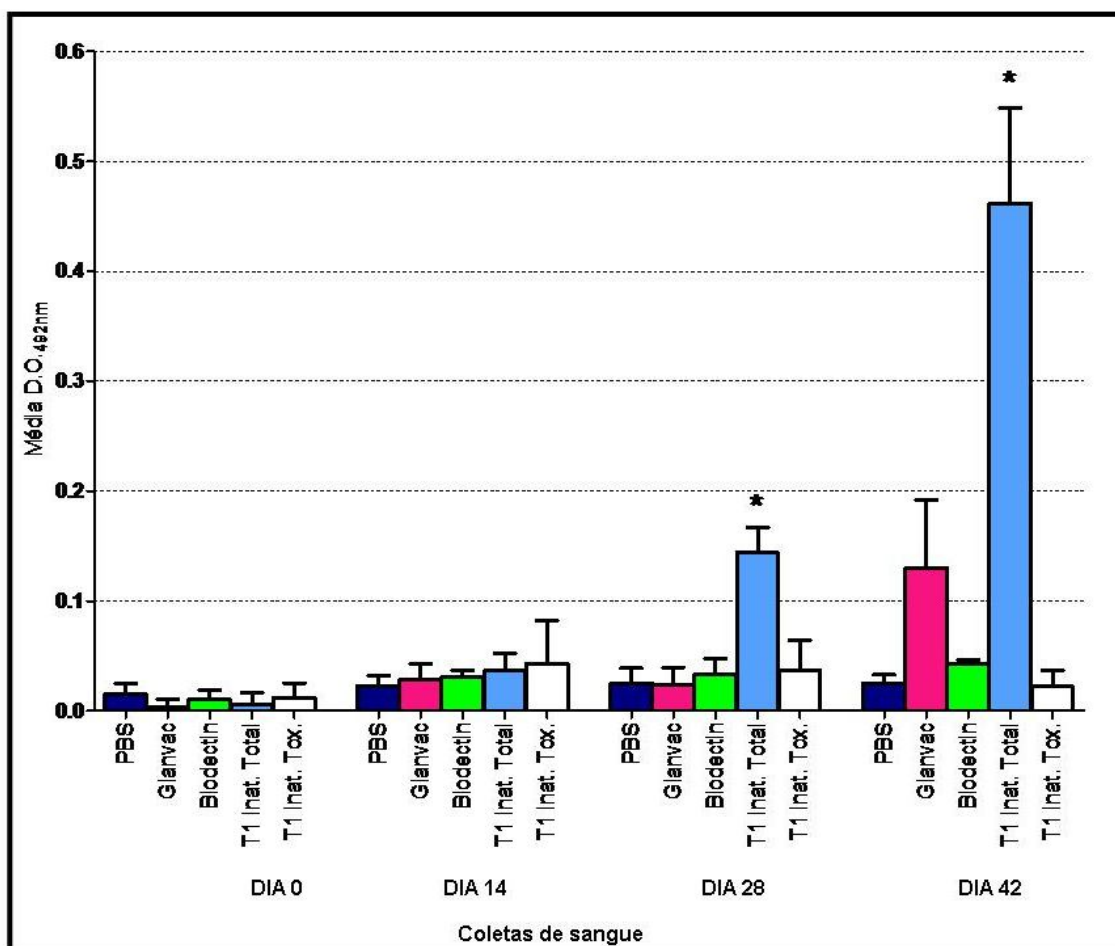
42) dos animais. O mesmo pôde ser observado nos animais imunizados com a vacina Glanvac™3, porém com níveis de produção de IgG bem menores. A imunização com a formulação Tox da linhagem T1 não levou à indução de IgG de forma visível nos camundongos submetidos a este tratamento. O mesmo ocorreu nos animais imunizados com a vacina Biodectin®.



**FIGURA 26:** Representação gráfica da produção de IgG específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox. Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0), 14, 28 e 42 dias após a imunização e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos. \*Significativos em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0.05$ ).

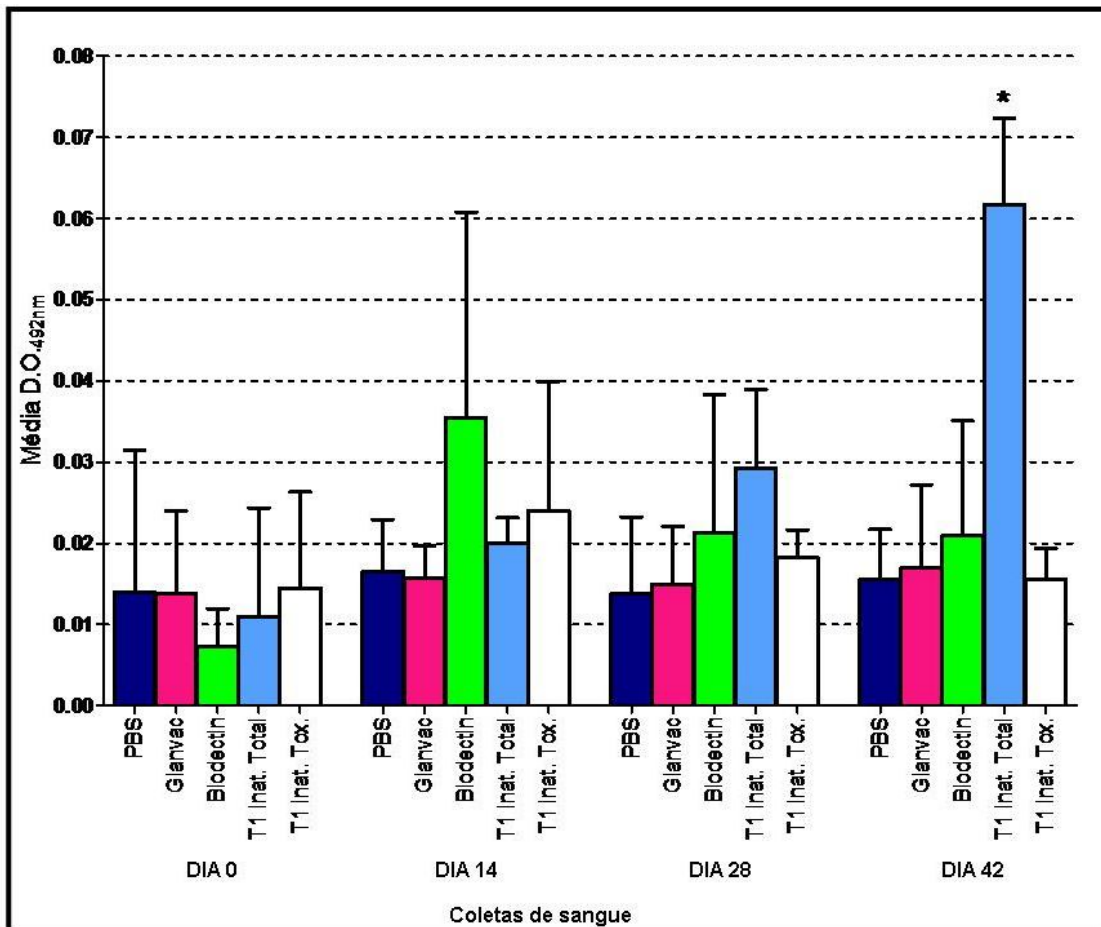
A produção do isotipo IgG1 induzida nos animais imunizados com as linhagens inativadas também foi avaliada e os resultados estão mostrados na FIGURA 27. Houve produção bastante significativa de IgG1 pelos animais imunizados com T1 inativada total. Esta produção foi especialmente alta após o período de revacinação dos camundongos (DIA

42). Um aumento discreto também foi observado naqueles animais imunizados com a vacina Glanvac™3, no entanto esta produção não foi significativa.



**FIGURA 27: Representação gráfica da produção de IgG1 específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox.** Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0), 14 , 28 e 42 dias após a imunização e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos. \*Significativos em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0.05$ ).

A produção de IgG2a avaliada está mostrada no gráfico da FIGURA 28. Entre os grupos testados podemos destacar aquele submetido ao tratamento com a linhagem T1 inativada Total cujos níveis de indução desta subclasse de imunoglobulinas foram bastante significativos, principalmente após a revacinação (DIA 42).



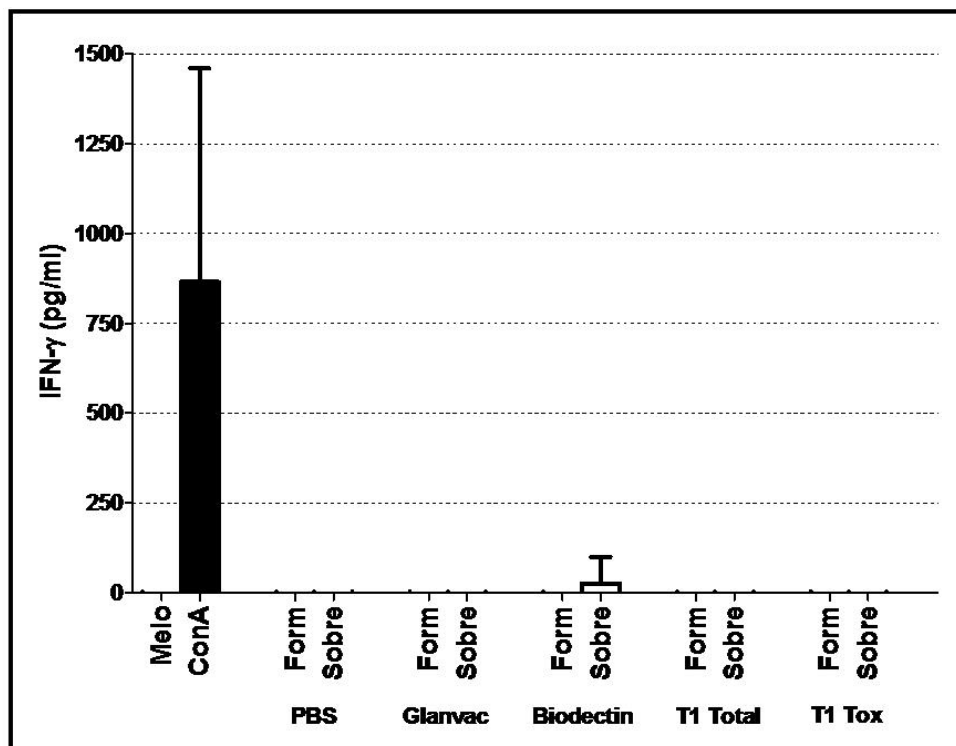
**FIGURA 28: Representação gráfica da produção de IgG2a específico pelos camundongos imunizados com as linhagens inativadas T1 total e T1 Tox.** Soros dos animais imunizados foram coletados antes (DIA 0), 14 , 28 e 42 dias após a imunização e testados por ELISA. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento representativo com dez animais por grupo de imunização. Os valores do branco foram subtraídos de cada valor obtido nos grupos.\*Significativos em relação ao grupo controle PBS ( $p < 0.05$ ).

#### **2.4. Caracterização do perfil de resposta imune celular induzido pela imunização dos camundongos com as linhagens inativadas de *C. pseudotuberculosis***

A resposta imune celular induzida após a vacinação dos animais com as linhagens selvagens inativadas, através da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4, também foi avaliada a partir de ensaios de ELISA utilizando o sobrenadante das culturas de esplenócitos estimuladas dos camundongos imunizados.

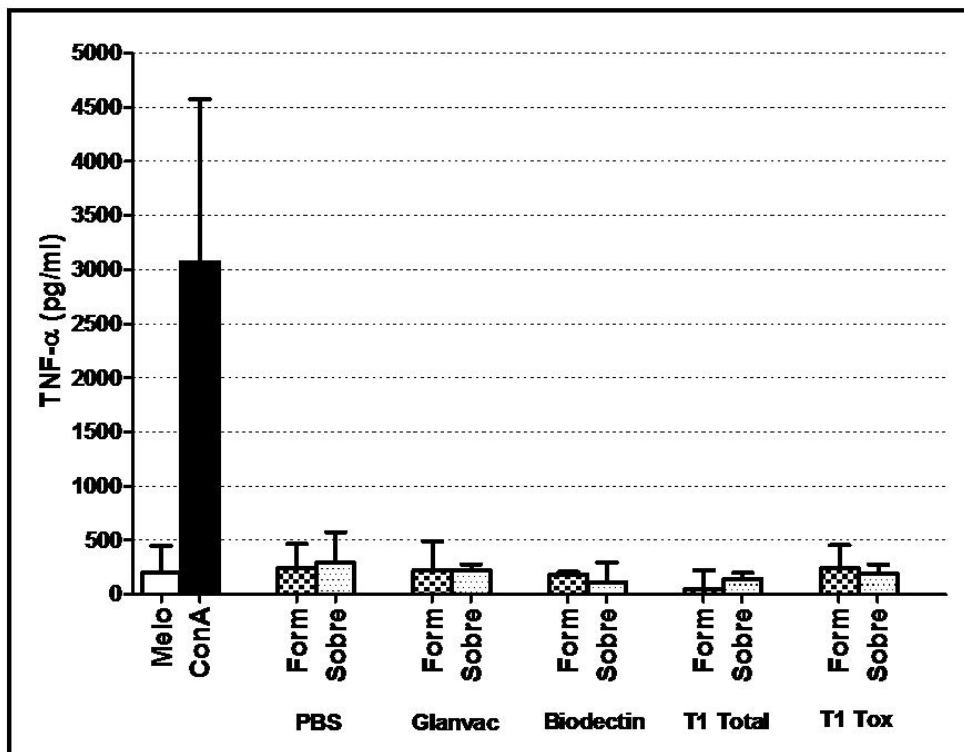
A FIGURA 29 mostra o gráfico da produção de IFN- $\gamma$  pelos animais imunizados com as linhagens inativadas. Como pode ser observado, não houve produção detectável desta citocina por nenhum dos grupos de animais imunizados.





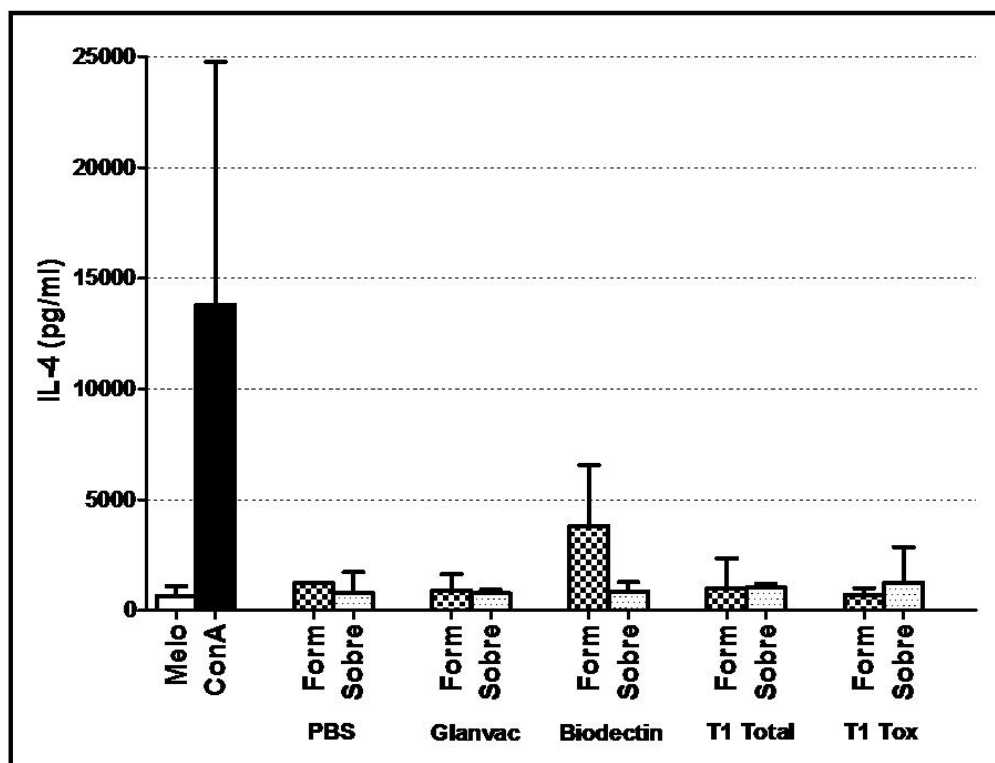
**FIGURA 29:** Representação gráfica da produção de IFN- $\gamma$  induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

A produção de TNF- $\alpha$  também foi avaliada e está ilustrada na FIGURA 30. Os resultados mostram que houve uma produção bastante discreta desta citocina e os níveis produzidos não se mostraram significativos quando comparados ao controle negativo, estimulado com meio de cultura.



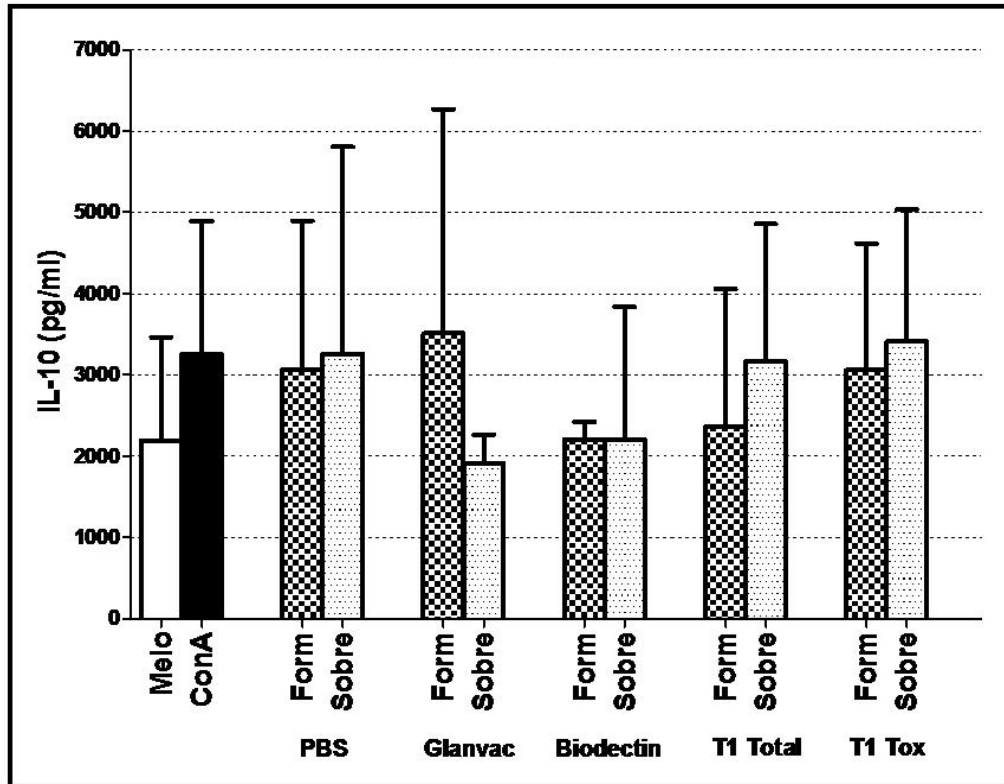
**FIGURA 30:** Representação gráfica da produção de TNF- $\alpha$  induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

A citocina IL-4 foi detectada apenas em níveis basais se comparados àqueles induzidos pelo controle com meio de cultura (FIGURA 31). Houve um aumento na produção desta citocina pelos animais imunizados com Biodectin®, no entanto, este aumento não se mostrou significativo.



**FIGURA 31:** Representação gráfica da produção de IL-4 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

A produção de IL-10 detectada nos ensaios de citocinas mostrou-se um pouco mais elevada, entretanto, os níveis obtidos não foram significativos em relação aos controles, meio de cultura e concanavalina A (FIGURA 32).



**FIGURA 32:** Representação gráfica da produção de IL-10 induzida nas células esplênicas dos animais imunizados com as linhagens inativadas, T1 Total e T1 Tox, de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de dez animais imunizados. No eixo das ordenadas estão descritos os estímulos utilizados no experimento. Meio – meio de cultura; ConA – concanavalina A; Form – cultura de células de *C. pseudotuberculosis* tratada com formalina; Sobre – Sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*. Leitura realizada a 450nm.

### 3. Discussão

Vacinas inativadas são baseadas em patógenos mortos e/ou suas frações inativadas (proteínas, polissacarídeos, toxóides e subunidades). Essas vacinas são produzidas após o crescimento da bactéria em meio de cultura e então sofrem inativação por calor ou algum produto químico, comumente formalina. Suas grandes vantagens são a incapacidade de replicar-se no hospedeiro e a impossibilidade de reverter para o estado selvagem virulento, podendo ser utilizada, por exemplo, em indivíduos imunocomprometidos (Dorella *et al.*, 2008). No entanto, essa mesma inabilidade em replicar-se também pode ser considerada uma desvantagem visto que ela não gera uma resposta imune efetiva e completa no hospedeiro, sendo assim, é necessária a aplicação de várias doses para que se alcance uma imunidade protetora duradoura. Esse tipo de vacina geralmente estimula a resposta imune humoral bem como a memória imunológica. A primeira dose não produz imunidade, somente “prepara” o sistema imune. Uma resposta imune protetora surge após a segunda ou terceira dose e os níveis de anticorpos diminuem com o tempo, por esse motivo são necessárias as revacinações. A resposta imune contra vacinas inativadas é, em sua maior parte, humoral, pouca ou quase nenhuma imunidade celular é detectada (Ellis, 2001). Para que seja capaz de estimular a resposta celular, normalmente, é administrada com adjuvantes (Petrovsky & Aguilar, 2004). Além disso, uma vacina inativada pode conter em sua formulação todos os componentes celulares bacterianos ou pode ser utilizada somente parte desta formulação como o sobrenadante da cultura inativada (Ellis, 2001).

Muitas das vacinas atualmente disponíveis no mercado contra a LC são vacinas inativadas. Este tipo de formulação, geralmente baseada em PLD inativada, permite a combinação com vacinas contra outros patógenos. A vacina comercial Biodectin® utilizada como um dos controles positivos deste trabalho, sem muito sucesso, é baseada em proteínas inativadas (toxóides) de *Clostridium septicum*, *Cl. novyi* Type B, *Cl. tetani* e *Cl. perfringens* Type D, além de culturas inativadas de *Cl. chauvoei*, *C. pseudotuberculosis ovis* e Moxidectin. Nosso outro controle positivo, a vacina Glanvac™3 é composta de suspensões aquosas de toxóides ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis*, *Cl. perfringens* Type D, *Cl. tetani*. Uma vacina, não disponível no mercado brasileiro, Case-Bac™ é baseada na combinação de cultura inativada (bacterina) e toxóide de *C. pseudotuberculosis*. Dada a importância das vacinas inativadas no combate às doenças infecciosas, e a ineficiência das vacinas descritas acima, principalmente no que diz respeito à proteção de caprinos contra a LC, procuramos testar essa alternativa também neste trabalho utilizando a versão inativada da linhagem T1, parental na construção dos mutantes.

No primeiro ensaio de imunização a linhagem inativada T1 foi a que mais se destacou levando à sobrevivência de mais de 80% dos animais imunizados, sendo então

selecionada para os ensaios finais. No entanto, foram observadas algumas reações durante as imunizações com todas as linhagens inativadas e vacinas comerciais, em maior ou menor grau. O surgimento de reações localizadas no sítio de inoculação da vacina, bem como outros efeitos colaterais, já foram relatados (Williamson, 2001; Paton *et al.*, 2003) e, apesar de inconvenientes, são considerados como uma “reação adversa normal” pelas empresas fabricantes das vacinas, como descrito nas respectivas bulas que acompanham os produtos. Essas reações cutâneas podem ser devido ao emprego do hidróxido de alumínio como adjuvante nas vacinas, comerciais e inativadas neste trabalho. Utilizados para potencializar a eficácia de alguns tipos de vacina, principalmente aquelas com compostos purificados e/ou vacinas com microrganismos mortos, os adjuvantes podem levar a reações como granulomas no sítio de inoculação da vacina (Petrovsky & Aguilar, 2004). Outra hipótese para o surgimento dessas reações se dá pela própria constituição da parede celular de *C. pseudotuberculosis*. Vários relatos na literatura descrevem o surgimento de lesões no sítio de inoculação em murinos e caprinos devido aos lipídios tóxicos da parede desta bactéria (Hodgson *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1994; Moura-Costa *et al.*, 2008). No entanto, essas reações não vieram a comprometer a utilização das vacinas.

Como mencionado neste tópico, a grande maioria das vacinas comerciais disponíveis contra a LC são baseadas em toxóides de *C. pseudotuberculosis*. Desta forma, além da versão completa, antígeno somático combinado ao antígeno secretado, que forma a versão T1 inativada Total, também foi testada a versão contendo somente o toxóide, denominada T1 inativada Tox. Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que T1 Total levou a 60% de proteção enquanto que a imunização com T1 Tox levou a somente 10% de proteção. Embora seja conhecida a capacidade individual de toxóides e bacterinas em conferir proteção, Burrell (1983) declarou que a proteção completa só é alcançada na presença de ambos, como ocorreu com a versão T1 inativada Total.

A imunização com as linhagens inativadas levou a uma indução bastante significativa de IgG total, principalmente após a revacinação. Os níveis de IgG1 e IgG2a também se mostraram bastante significativos, sendo que houve a prevalência de IgG1, dirigindo a resposta contra a vacina para o tipo Th2, característica contra patógenos extracelulares e antígenos presentes em vacinas inativadas, onde há a predominância de resposta humoral (Machado *et al.*, 2004). Os ensaios para a avaliação da produção de citocinas, assim como para as linhagens recombinantes, não revelaram a produção significativa de nenhuma das citocinas mensuradas.

Os dados obtidos neste capítulo sugerem que a linhagem T1 inativada Total também pode ser utilizada como uma potencial vacina inativada no combate à LC, uma vez que levou a altos níveis de proteção bem como induziu altos níveis de anticorpos específicos.

# SEÇÃO V

## 1. Conclusões

Nas condições do presente estudo é possível concluir que:

1. Dentre as linhagens recombinantes testadas neste trabalho, a linhagem recombinante CP13 apresentou a mais alta porcentagem de sobrevivência dos camundongos imunizados;
  - iii. Esta linhagem foi capaz de induzir níveis significativos de IgG total e IgG2a, indicando a indução do tipo de resposta Th1, característica na eliminação de *C. pseudotuberculosis*;
  - iv. Não foi possível definir o padrão de resposta celular uma vez que os ensaios de detecção de citocinas não revelaram a indução de quaisquer das citocinas mensuradas;
  - v. Os ensaios de interação dos mutantes CP09 e CP13 com células murinas revelaram que as mutações que ambas abrigam reduziram sua capacidade de se aderir a essas células e diminuíram drasticamente sua capacidade de sobrevivência dentro das mesmas, respectivamente;
  - vi. As análises *in silico* revelaram que o mutante selecionado CP13 é deficiente na produção de uma proteína secretada relacionada ao sistema de transporte de ferro, que se mostrou essencial na sobrevivência desta bactéria dentro das células do hospedeiro, como revelado pelos ensaios *in vitro*;
  - vii. Essas análises nos permitem concluir que CP13 possa ser utilizada como uma vacina viva recombinante, atenuada, capaz de induzir resposta imune em modelo murino.
2. Dentre as linhagens selvagens inativadas testadas neste trabalho, a linhagem T1 em sua versão inativada Total, constituída de antígenos somáticos e secretados, foi a que levou a mais alta porcentagem de sobrevivência dos animais imunizados;
  - i. Esta linhagem foi capaz de induzir níveis significativos das imunoglobulinas testadas, indicando que o tipo de resposta induzida, humoral, condiz com aquela esperada para imunizações com vacinas inativadas;
  - ii. Assim como ocorreu para as linhagens recombinantes, não foi possível verificar a indução das citocinas nos animais imunizados;
  - iii. Os resultados obtidos permitem concluir que a linhagem T1 inativada Total também possa ser utilizada como alternativa vacinal no combate à LC.



## 2. Perspectivas

Os resultados mostrados neste trabalho revelaram que as linhagens CP13 e T1 inativada Total foram capazes de proteger os camundongos contra a infecção pela linhagem selvagem, no entanto, o repertório imunológico induzido pelas imunizações não foi suficiente para esclarecer o tipo de resposta imune gerada e explicar a proteção observada.

Sendo assim este trabalho abre perspectivas para:

- realização de novos ensaios de imunização em camundongos com modificações nos regimes de coletas de amostras, soros e esplenócitos, cronograma de imunizações, estímulos utilizados visando resultados que levem a um melhor entendimento do tipo de resposta gerada pela imunização;

- testes imunológicos nos animais-alvo da doença, caprinos e ovinos, a fim de verificarmos se os índices de proteção observados em camundongos serão mantidos. Testes-piloto em caprinos e ovinos já estão sendo realizados e novos testes estão agendados com a empresa de produtos veterinários Vallée S.A., visando verificar a reprodutibilidade dos bons resultados previamente obtidos em murinos;

- se confirmados os resultados esperados de proteção, passar-se-á então à construção de uma linhagem vacinal desprovida de qualquer elemento exógeno (transposon), seja ele marcador de resistência a antibiótico ou fenotípico com a finalidade de atender às exigências de órgãos reguladores como a Comissão Técnica nacional de Biossegurança (CTNBio), uma vez que o mutante é um organismo geneticamente modificado;

- em um futuro próximo, visa-se a transferência desta tecnologia para a empresa colaboradora Vallée S.A. capaz de produzir a vacina em larga escala e lançá-la no mercado, visando assim à redução dos altos níveis da doença nos rebanhos brasileiros.

# SEÇÃO VI

## 1. Referências Bibliográficas

**Alves, F.S.F. & Olander, H.J.** (1998). Uso de uma vacina toxóide no controle da LC dos caprinos. *Ver. Bras. Méd. Vet.*, 20:74-77.

**Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Pires, P.C.** (1997). Linfadenite caseosa: patogenia-diagnóstico- controle, Artigo Técnico. Documento nº 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

**Arsenault J., Girard C., Dubreuil P., Daignault D., Galarneau J.-R., Boisclair J., Simard C., Bélanger D.** (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canadá. *Prev. Vet. Med.*, 59: 67–81.

**Al-Rawashdeh, O.F., Al-Qudah, K.M.** (2000). Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in awassi sheep in Jordan. *J. Vet. Med. B*, 47, 287–293.

**Baird, G.J. & Fontaine, M.C.** (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137:179-210.

**Bartolomé, J., Roca, M.J., Marcote, E., Moreno R.** (1995). *Corynebacterium pseudotuberculosis* adenitis in a shepherd. *Med Clin (Barc)*., 104:699-701.

**Ben Said, M.S., Ben Maitigue, H., Benzarti, M., Messadi, L., Rejeb, A., Amara, A.** (2002). Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.*, 79, 51-57.

**Billington, S.J., Esmay, P.A., Songer, J.G., Jost, B.H.** (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 41-45.

**Binns, S.H., Bailey, M., Green, L.E.** (2002). Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet. Rec.*, 150, 263-268.

**Brogden K.A., Chedid L., Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Sacks J.** (1990). Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs, *Am. Vet. Res.* 51: 200-202.

**Burrell, D.H.** (1983). Caseous lymphadenitis vaccine. *New South Wales Veterinary Proceedings*, 19:53-57.

**Cameron, C.M.** (1972). Immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. South African Vet. Assoc.*, 43:343-349.

**Cameron, C.M. & Bester, F.J.** (1984). An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 51:263-267.

**Carne, H.R. & Onon, E.O.** (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. *Nature*, 271:246-248.

**Chaplin, P.J., De Rose, R., Boyle, J.S., McWaters, P., Kelly, J., Tennent, J.M., Lew, A.M., Scherlinck, J.-P.Y.** (1999). Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, 67:6434–6438.

**Connor, K.M., Quirie, M.M., Baird, G., Donachie, W.** (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2633–2637.

**Denis, M.** (1991). Modulation of *Mycobacterium lepraemurium*: growth in murine macrophages: beneficial effect of tumor necrosis factor alpha and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Infect. Immun.* 59:705–707.

**Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V.** (2006a). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201–218.

**Dorella, F.A., Estevam, E.M., Pacheco, L.G.C., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Gomes, E.A., Barsante, M.M, Oliveira, S.C., Meyer, R., Miyoshi, A. and Azevedo, V.** (2006b). *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7368-7372.

**Dorella, F.A., Estevam, E.M., Cardoso, P.G.C., Savassi, B.M., Oliveira, S.C., Azevedo, V., Miyoshi, A.** (2006c). An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 114: 298–303.

**Dorella, F.A., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V.** (2008). Vacinas e a Erradicação da LC. *Microbiologia in foco* (Sociedade Brasileira de Microbiologia) 5: 26-31.

**Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R.W., Miyoshi, A., Azevedo, V.** (2009). Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Exp. Rev. Vaccine*, 8: 205-213.

**Dougan, G.** (1994). The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. 1993 Colworth Prize Lecture. *Microbiology*, 140:215-24.

**Eggleton, D. G., Haynes, J. A., Middleton, H. D., Cox, J. C. and Minty, D. W.** (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Vet. J.* 68: 322-325.

**Ellis, J.A., Hawk, D.A., Mills, K.W., Pratt, D.L.** (1991). Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 303-316.

**Ellis, R.W.** (2001). Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, 19:2681-2687.

**Faria, G.A., Morais, O.R., Guimarães, P.H.S.** (2004). Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [on-line]. Disponível em: [www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere\\_para\\_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf](http://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf).

**Foss, D.L. & Murtaugh, M.P.** (2000). Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces. *Anim. Health Res. Rev.*, 1:3-24.

**Gibson, C.M., Caparon, M.G.** (2002). Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:928-932.

**Guimarães, A.S.** (2006). Caracterização da caprinocultura e ovinocultura em Minas Gerais [Dissertação (Mestrado)]. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**Hodgson, A.L., Krywult, J., Corner, L.A., Rothel, J.S., Radford, A.J.** (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect Immun.* 60:2900-2905.

**Hodgson, A.L.M., Tachedjian, M., Corner, L.A., Radford, A.J.** (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62:5275-5280.

**Hodgson, A.L.M., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L.A., McColl, M., Cameron, A.** (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 17:802-808.

**Holstad G.** (1989). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection, *Acta Vet. Scand.* 30: 285-293.

**Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., Beuvery, E.C.** Vaccine. In: Pharmaceutical Biotechnology – An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists, Crommelin, DJA e Sindelar, RD (Eds.), Londres, Taylor & Francis Group, 2002, 2a. Edição, Cap 12. pp. 259-282.

**Jolly R.D.** (1965). The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *N. Z. Vet. J.* 13:141-147.

**Kaplan, C., Valdez, J.C., Chandrasekaran, R., Eibel, H., Mikecz, K., Glant, T.T., Finnegan, A.** (2002). Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res.* 4:54-58.

**Lan, D.T.B, Makino, S., Shirahata, T., Yamada, M., Nakane, A.** (1999). Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61:1203–1208.

**LeaMaster B.R., Shen D.T., Gorham J.R., Leathers C.W., Wells H.D.** (1987). Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis, *Am. J. Vet. Res.* 48: 869-872.

**Lipsky, B.A., Goldberger, A.C., Tompkins, L.S., Plorde, J.J.** (1982). Infections caused by nondiphtheria corynebacterial. *Rev. Infect. Dis.* 4:1220–1235.

**Machado, P.R.L., Araújo, M.I.A.S., Carvalho, L., Carvalho, E.M.** (2004). Immune response mechanisms to infections. *An. Brás. Dermatol.*, 79:647-664.

**Moura-Costa, L.F., Bahia, R.C., Carminati, R., Vale, V.L.C., Paule, B.J.A., Portela, W., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Barreto, L.M.S., Meyer, R.** (2008). Evaluation of the humoral and cellular immune response o different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126:131-141.

**Movahedi, A.R. & Hampson, D.J.** (2008). New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Vet. Microbiol.*, 131:1-13.

**Mowat, N., Rweyemamu, M.** (1997). Vaccine manual, the production and quality control of veterinary vaccines for use in development countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations, n° 35, FAO.

**Nakane, A., Numata, A., Chen, Y., Minagawa, T.** (1991). Endogenous gamma interferon-independent host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in CD4+ T Cell and asialo GM1+ cell- depleted mice. *Infect. Immun.* 59:3439-3445.

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

**Paule, B.J.A., Azevedo, V., Regis, L.F., Carminati, R., Bahia, C.R., Vale, V.L.C., Moura-Costa, L.F., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Goes, A.M., Meyer, R.** (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96:129–139.

**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.*, 24:185–191.

**Pépin, M., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F., Arrigo, J. L.** (1993). Acquired immunity after primary caseous lymphadenitis in sheep. *American J. Vet. Res.*, 54:873-877.

**Pépin, M., Pittet, J-C., Olivier, M., Gohint, I.** (1994). Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukocyte Biol.* 56, 666-670.

**Pépin, M., Seow, H.F., Corner, L., Rothel, J.S., Hodgson, A.L., Wood, P.R.** (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet Res.* 28:149-163.

**Petrovsky, N., Aguilar, J.C.** (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 82: 488-496.

**Piontkowski, M.D., Shivvers, D.W.** (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212:1765–1768.

**Pogson, C.A., Simmons, C.P., Strugnelli, R. A., Hodgson, A.L.M.** (1996). Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development. *FEMS Microbiol. Lett.* 142:139–145.

**Regis L.** (2001). Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis* [Dissertação (mestrado)]. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

**Ribeiro M.G., Júnior J.G.D., Paes A.C., Barbosa P.G., Júnior G.N., Listoni F.J.P.** (2001). Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na LC caprina, *Arq. Inst. Biol.* 68: 23-28.

**Schatzmayer, H.G.** (2003). Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos*, vol. 10 (suplemento 2): 655-669.

**Selim A.S.** (2001). Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 48: 241–258.



**Seyffert, N., Guimarães, A.S., Bastos, B.L., Pacheco, L.G.C., Dorella, F.A., Heinemann, M.B., Lage, A.P., Gouveia, A.M.G., Portela, R.W., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V.** High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat flocks revealed by ELISA with *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins (manuscrito submetido).

**Shaw, T., Thomas, L.H., Friedland, J.L.** (2000). Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine* ,12:483–486.

**Silva, C.L., Bonato, V.L.D., Castelo, A.A.M.C., Lima, K.M., Rodrigues Júnior, J.M.** Vacinas Gênicas. In: Livro Genômica, Luis Mir (Ed.), Editora Atheneu, São Paulo, 2004, Cap 23, páginas 463- 493.

**Simmons, C.P., Hodgson, A.L.M., Strugnell, R.A.** (1997). Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, 65:3048-3056.

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

**Songer, J.G., Hilwig, R.W., Leeming, M.N., Iandolo, J.J., Libby, S.J.** (1991). Transformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by eletroporation. *Am. J. Vet. Res.*, 52:1258-1261.

**Songer, J.G.** (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5:156–160.

**Stehman, S.M.** (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12:441-455.

**Tachedjian, M., Krywult, J., Moore, R.J., Hodgson, A.L.M.** (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, 13: 1785-1792.

**Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A., Kalinowski, J.** (2002). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Cur. Microbiol.*, 45: 362-367.

**van der Rest, M. E.; Lange, C., Molenaar, D.** (1999). A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:541-545.

**Williamson L.H.** (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17: 359–371.

**Sítios utilizados neste trabalho:**

<http://www.pubmed.gov>

<http://www.snagricultura.org.br>

<http://www.ibge.gov.br/>

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.uniprot.org/uniprot>

<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>

<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

[http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)

## **2. Anexos**

Neste anexo encontram-se todas as comunicações científicas (capítulos de livro, trabalhos em congressos e eventos, publicações em periódicos, magazines e trabalhos técnicos) produzidas pela aluna Fernanda Alves Dorella durante o curso de seu Doutorado. As comunicações encontram-se separadas por anos.

## 2005

### **- Incursão no Doutorado da Pós-graduação em Genética (março)**

#### **- Capítulo de livro:**

1. DORELLA, FA; PACHECO, LG; GUIMARÃES, Valéria D; MIYOSHI, A; FREITAS, DB; AZEVEDO, V. Vacinas de DNA: novas vias de administração. In: Neuza Maria Brunoro Costa; Aluizio Borém; Carla O. Barbosa Rosa. (Org.). Alimentos Transgênicos - Saúde e Segurança. Viçosa: Folha de Viçosa, 2005, v., p. 193-210.

#### **- Participação em congressos (trabalhos):**

1. DORELLA, FA; ESTEVAM, EM; PACHECO, LGC; GUIMARÃES, CT; LANA, UGP; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. IDENTIFICATION OF GENES CODIFYING Corynebacterium pseudotuberculosis Exported proteins using in vivo transposition system based on TnFuZ. In: VIII Encontro de Pesquisa do ICB - III ENAPEBI, 2005, Belo Horizonte.

2. DORELLA, FA; ESTEVAM, EM; PACHECO, LGC; GUIMARÃES, CT; LANA, UGP; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. In vivo insertional mutagenesis in Corynebacterium pseudotuberculosis: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

3. DORELLA, FA; ESTEVAM, EM; CARDOSO, PG; SAVASSI, BM; OLIVEIRA, SC; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A. An improved protocol for electrotransformation of Corynebacterium pseudotuberculosis. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

4. PACHECO, LGC; PENA, RR; CASTRO, TLP; DORELLA, F A; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Development of a new multiplex PCR assay for the identification of Corynebacterium pseudotuberculosis isolated from clinical samples. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

5. PENA, RR; AZEVEDO, V, DORELLA, FA; ESTEVAM, EM; GUIMARÃES, CT; MIYOSHI, A. Identificação de genes codificadores de proteínas exportadas de Corynebacterium pseudotuberculosis através da utilização do sistema de transposição in vivo baseado no TnFuZ. In: XIV Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, Belo Horizonte.

6. PACHECO, LGC; PENA, RR; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. A MULTIPLEX-PCR ASSAY FOR THE SPECIFIC DETECTION OF CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS IN CLINICAL SAMPLES. In: III Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia da UFMG, 2005, Belo Horizonte.

## 2006

### **- Publicação em periódicos:**

1. DORELLA, FA; PACHECO, LGC; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research, França*, v. 37, p. 201-218, 2006.
2. DORELLA, F A; ESTEVAM, EM; CARDOSO, PG; SAVASSI, BM; OLIVEIRA, SC; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology (Amsterdam), Estados Unidos*, v. 114, p. 298-303, 2006.
3. DORELLA, FA; ESTEVAM, EM; PACHECO, LGC; GUIMARAES, CT; LANA, UGP; GOMES, EA; BARSANTE, MM; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. In Vivo Insertional Mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an Efficient Means To Identify DNA Sequences Encoding Exported Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7368-7372, 2006.
4. DORELLA, FA; FACHIN, MS; BILLAULT, A; DIAS NETO, E; SORAVITO, C; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genetics and Molecular Research*, v. 5, p. 653-663, 2006.(em anexo)

## Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing

F.A. Dorella<sup>1</sup>, M.S. Fachin<sup>1</sup>, A. Billault<sup>2</sup>, E. Dias Neto<sup>3</sup>, C. Soravito<sup>2</sup>, S.C. Oliveira<sup>4</sup>, R. Meyer<sup>5</sup>, A. Miyoshi<sup>1</sup> and V. Azevedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup>Centre d'Étude du Polymorphisme Humain-CEPH, Paris, France

<sup>3</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>5</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Vale do Canela, Salvador, BA, Brasil

Corresponding author: V. Azevedo

E-mail: vasco@icb.ufmg.br

Genet. Mol. Res. 5 (4): 653-663 (2006)

Received July 14, 2006

Accepted September 7, 2006

Published November 1, 2006

**ABSTRACT.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a gram-positive bacterium that causes caseous lymphadenitis in sheep and goats. However, despite the economic losses caused by caseous lymphadenitis, there is little information about the molecular mechanisms of pathogenesis of this bacterium. Genomic libraries constructed in bacterial artificial chromosome (BAC) vectors have become the method of choice for clone development in high-throughput genomic-sequencing projects. Large-insert DNA libraries are useful for isolation and characterization of important genomic regions and genes. In order to identify targets that might be useful for genome sequencing, we constructed a *C. pseudotu-*

*berculosis* BAC library in the vector pBeloBAC11. This library contains about 18,000 BAC clones, with inserts ranging in size from 25 to 120 kb, theoretically representing a 390-fold coverage of the *C. pseudotuberculosis* genome (estimated to be 2.5-3.1 Mb). Many genomic survey sequences (GSSs) with homology to *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, and *C. jeikeium* proteins were observed within a sample of 215 sequenced clones, confirming their close phylogenetic relationship. Computer analyses of GSSs did not detect chimeric, deleted, or rearranged BAC clones, showing that this library has low redundancy. This GSSs collection is now available for further genetic and physical analysis of the *C. pseudotuberculosis* genome. The GSS strategy that we used to develop our library proved to be efficient for the identification of genes and will be an important tool for mapping, assembly, comparative, and functional genomic studies in a *C. pseudotuberculosis* genome sequencing project that will begin this year.

**Key words:** Bacterial artificial chromosome library, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Genomic survey sequence

## INTRODUCTION

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, a gram-positive intracellular pathogen, is the causative agent of caseous lymphadenitis in sheep and goats. The widespread occurrence and the economic importance of this disease have prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic basis of *C. pseudotuberculosis* virulence is still unknown (Dorella et al., 2006). The massive accumulation of prokaryotic DNA sequences generated by microbial genome projects allows us to rapidly investigate biological features and identify new molecular targets that might be useful for the development of immunological or chemotherapeutic reagents against any organism of choice (Celestino et al., 2004). Construction and characterization of a *C. pseudotuberculosis* library will facilitate further genetic studies of this organism, including the sequencing of its entire genome.

Large insert libraries in bacterial artificial chromosome (BAC) vectors are particularly important, not only for genome sequencing projects, but also for comparative and functional genomic studies (Battistoni et al., 2005). The physical maps constructed with BACs are still widely used in genome research (Zhang and Wing, 1997). The BAC system is based on the well-studied *Escherichia coli* F factor. Replication of the F factor in *E. coli* is strictly controlled, since the F plasmid is maintained in low copy number (one or two per cell), thus reducing the potential for recombination between DNA fragments carried by the plasmid. F factors carrying inserted bacterial DNA are capable of maintaining fragments as large as 1 Mb, suggesting that the F factor is suitable for cloning large DNA fragments (Shizuya et al., 1992; Tillet and Neilan, 1998). The choice of the BAC cloning system

allows us not only to cover the entire genome with a relatively small number of clones, but also to reduce the potential for recombination between DNA fragments, and more importantly, to avoid lethal overexpression of cloned bacterial genes (Amemiya et al., 1999). The BAC system allows us to clone large DNA molecules from a variety of complex genomic sources into bacteria, in which the DNA is stable, easy to manipulate, and is from a single foreign DNA source. The genetic stability of cloned DNA may be one of the most important aspects of this system (Shizuya et al., 1992; Zhang et al., 1996; Simon, 1997). BAC libraries of genomic DNA from numerous eukaryotic species have been constructed, and this has become the preferred approach for sequencing projects (Shizuya et al., 1992; Zhang et al., 1996; Zhang and Wing, 1997; Rogel-Gaillard et al., 1999). Furthermore, genomic libraries are a powerful resource for genetic studies of bacteria; there are various examples of successful use of this technology (Philipp et al., 1996; Brosch et al., 1998; Capela et al., 1999; Gordon et al., 1999; Brodin et al., 2002; Tauch et al., 2002, 2005; Feng et al., 2005; Walter et al., 2005).

We describe here the construction of a *C. pseudotuberculosis* BAC library in pBeloBAC11 (Shizuya et al., 1992) and the beginning of the characterization of this library through a BAC-end sequencing strategy, namely genomic survey sequencing (GSS) (Kelley et al., 1998; Zhao, 2000; Ripoll et al., 2000).

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strains, growth conditions and plasmid

We used the bacterial strain *C. pseudotuberculosis* 1002, a wild strain provided by Dr. Roberto Meyer from the “*Corynebacterium pseudotuberculosis* Culture Collection”, Laboratory of Immunology (Federal University of Bahia); identification was confirmed by biochemical tests (API CORYNE, Biomerieux, Marcy l’Etoile, France). The *E. coli* strain used was *E. coli* DH10B (F<sup>-</sup> *mcrA* Δ (*mrr-hdsRMS-mcrBC*) φ80d *LacZ* ΔM15 Δ*Lac* X74 *endA1 recA1 deoR* Δ (*ara,leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL* λ<sup>-</sup>; Grant et al., 1990). The plasmid pBeloBAC11 was as previously described (Shizuya et al., 1992).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* 1002 was aerobically grown in 2X YT (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) medium. *E. coli* was aerobically grown at 37°C in Luria-Bertani medium (LB, Difco Laboratories). When necessary, the medium was supplemented with chloramphenicol (12.5 µg/mL).

### BAC vector preparation

Plasmid pBeloBAC11 preparation was carried out as described by Woo et al. (1994).

### Preparation of source chromosomal DNA

High-molecular weight *C. pseudotuberculosis* DNA used in library construction was prepared on agarose plugs according to Azevedo et al. (1993). Plugs were stored in 50 mM EDTA at 4°C and washed three times in 0.1% Triton X-100 buffer prior to use. Partial digestion and size selection were carried out as previously described (Brosch et al., 1998).



### Cloning of *C. pseudotuberculosis* DNA into pBeloBAC11

Agarose containing the selected fragments was melted at 70°C for 5 min and digested with GELase (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA), using 1 U per 100 µL of gel slice. Then, a *C. pseudotuberculosis* library was constructed by ligation of partially digested *Hind*III fragments (25-120 kb) into a previously prepared pBeloBAC11 vector, in a 1:10 molar ratio using 5 U T4 Ligase (Invitrogen Ltd., CA, USA), at 16°C for 18 h. Ligation mixtures were heated to 65°C for 15 min and then drop-dialyzed against Tris-EDTA, using VS 0.025 mM membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Transformation of *E. coli* DH10B was carried out by electroporation. Competent cells were prepared; electroporation and selection of recombinants were performed according to Brosch et al. (1998). Each selected clone (white colony) was inoculated manually into 96-well plates, containing 100 µL LB plus chloramphenicol (12.5 µg/mL) and incubated at 37°C overnight. After incubation, 100 µL of 80% glycerol was added to each well; the plates were sealed with polyester film and stored at -70°C.

### Sizing of BAC DNA inserts

BAC DNA from recombinant clones was isolated by the alkaline lysis method, as previously described (Birnboim and Doly, 1979), with minor modifications. To estimate the insert size, BAC DNA was digested with *Not*I and analyzed by PFGE using a 1% Agarose SeqPlaques gel in 1X TAE buffer and 0.5 µg/mL ethidium bromide at 10°C, with a ramp time from 4 s at 6.25 V/cm for 15 h on an LKB-Pharmacia CHEF apparatus. The MidRange II PFGE marker (New England Biolabs) was used as a size standard.

### GSS generation through BAC-end sequencing

Sequencing reactions were performed using the *Taq* DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit in an ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing primers were M13 (-40, forward) 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3' and M13 (reverse) 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'. One microgram of DNA and 5 µM of the primers were added to 14-µL reaction mixtures containing 5 µL of dye terminator premix. Sequencing reactions were cycled according to the following program: 5 min at 95°C and 40 cycles of 20 s at 95°C, 15 s at 55°C and 1 min at 60°C. Reaction products were purified as follows: 120 µL 75% isopropanol (v/v) was added to samples, which were incubated in the dark for 20 min at room temperature. The samples were then centrifuged at 14 rpm for 20 min and the supernatants were discarded; 100 µL 70% ethanol (v/v) was added and the resulting mixture was centrifuged at 14 rpm for 10 min. The supernatants were discarded and the DNA was resuspended in 10 µL deionized formamide.

### Bioinformatics

Similarity searches of each BAC-end sequence were made with the “Basic Local Alignment Search Tool” software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) service of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). GSSs were classified according to BLASTx

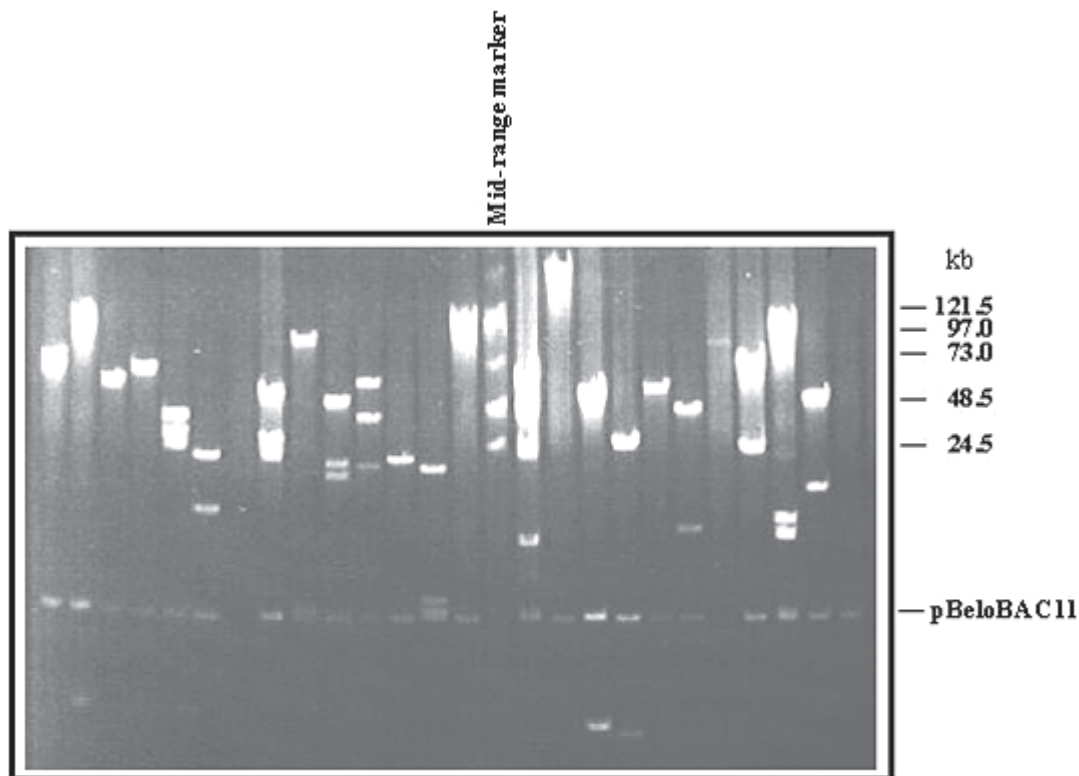
analysis. Only those GSSs with a positive match [best BLAST hit with an expected value ( $E$ ) of  $<10^{-10}$  and score  $>42$ ] for a protein in the non-redundant database were considered.

### Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences that were identified were deposited in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) under accession numbers BH740422 to BH740650.

## RESULTS AND DISCUSSION

A genomic library with approximately 18,000 clones was constructed as described in Material and Methods, with inserts with an average size of 25 to 120 kb (Figure 1). A random sample of 215 clones was successfully end sequenced and deposited in the GenBank databases.



**Figure 1.** Random samples of BAC DNA digested with *NotI* and analyzed by PFGE for estimating the insert sizes of BACs.

After deleting vector sequences and unreliable data, an average of 359 bases per clone was obtained and used for database searches. These data theoretically represent a 390-fold coverage of the *C. pseudotuberculosis* genome (estimated to be 2.5-3.1 Mb; Redenbach et al., 2000). The redundancy of the library was estimated to be 13% through sequence alignment using the CAP3 software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). A high-quality genomic library

must display a value lower than 20% redundant sequences, clones without inserts or clones with contamination.

Sequence similarities identified by BLASTx were considered statistically significant (*E*) at  $<10^{-10}$  and score  $>42$ . Among the 229 GSSs obtained, 123 (53.7%) had a significant match with proteins of the GenBank database.

Table 1 shows the best BLASTx hits obtained in the similarity searches; the organisms were ordered according to the degree of conservation. A significant number of valid GSSs showed similarity with *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens*, and *C. jeikeium* proteins, confirming their close phylogenetic relationship (Figure 2). Similarity with proteins from other groups was also observed. Three GSSs presented similarity with *C. pseudotuberculosis* sequences (1 for 16S rRNA and 2 for RpoB), validating this method for *C. pseudotuberculosis*.

**Table 1.** Similarity searches of BAC-end sequences.

GSS Accession number	Function of best BLASTx hit	Source	Score	E-value
BH740423	Peptide deformylase	Cd	194	3e-14
BH740425	6-Phosphogluconate dehydrogenase	Cj	318	2e-28
BH740428	Putative siderophore-binding protein	Cd	238	5e-19
BH740431	Hypothetical protein DIP2051	Cd	225	1e-17
BH740433	Betaine aldehyde dehydrogenase	Cd	577	2e-58
BH740434	ATPase involved in DNA repair	Cg	172	1e-11
BH740438	Hypothetical protein CE2578	Ce	266	2e-22
BH740442	Adenine phosphoribosyltransferase	Cd	263	4e-22
BH740444	Putative rRNA methyltransferase	Cd	163	2e-10
BH740446	Putative cytochrome C-related protein	Cd	337	1e-30
BH740449	Hypothetical protein CE2945	Ce	263	8e-22
BH740450	Bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase	Cd	617	7e-63
BH740452	Putative cytochrome C-related protein	Cd	438	2e-42
BH740454	Putative peptide transport system membrane protein	Cd	546	6e-55
BH740456	Phosphate acetyltransferase	Cd	251	1e-20
BH740457	DNA ligase	Cd	436	4e-42
BH740458	50S ribosomal protein L4	Cd	762	7e-80
BH740459	Putative helicase	Cd	369	2e-34
BH740460	Putative transferase	Cd	244	6e-20
BH740461	Hypothetical protein DIP0733	Cd	306	4e-27
BH740465	Putative phosphoserine phosphatase	Ce	420	3e-40
BH740467	Putative glycosyltransferase	Cd	342	4e-31
BH740469	Phosphate ABC transport system, ATP-binding protein	Cj	360	3e-33
BH740470	Methylmalonyl-CoA mutase	Cd	476	8e-47
BH740472	DNA gyrase subunit A	Cd	399	1e-37
BH740473	DeaD/DeaH family helicase	Cd	487	8e-48
BH740475	16S rRNA gene	Cp	219	5e-17
BH740477	Choline dehydrogenase	Cd	212	3e-16
BH740478	DeaD/DeaH family helicase	Cd	416	8e-40
BH740479	Hypothetical protein DIP1287	Cd	269	8e-23
BH740481	Guanosine pentaphosphate synthetase/polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Cd	229	4e-18
BH740486	Hypothetical protein DIP0165	Cd	218	1e-16
BH740487	Hypothetical protein DIP1567	Cd	199	1e-14

Continued on next page

Table 1. Continued.

GSS Accession number	Function of best BLASTx hit	Source	Score	E-value
BH740488	Putative hydrolase	Cd	285	1e-24
BH740489	RpoB	Cp	450	9e-44
BH740491	ATP-dependent Clp protease	Cj	175	9e-12
BH740493	Putative tetR-family transcriptional regulator	Cd	280	4e-24
BH740494	Elongation factor EF-2	Cd	542	2e-54
BH740495	Putative sialidase precursor	Cd	499	2e-49
BH740497	Putative oxidoreductase	Cd	397	1e-37
BH740496	Putative thiosulfate sulfurtransferase	Cd	521	5e-52
BH740498	Endonuclease III	Cd	467	1e-45
BH740500	Putative oxidoreductase390	Cd	390	3e-37
BH740501	Putative protoporphyrinogen oxidase HemK	Ce	475	7e-47
BH740502	Putative membrane protein	Cd	381	6e-36
BH740503	Peptide methionine sulfoxide reductase A	Cd	576	9e-59
BH740504	Conserved hypothetical protein	Cd	266	9e-23
BH740505	Hypothetical protein DIP0651	Cd	424	4e-41
BH740506	Choline dehydrogenase	Cd	693	3e-72
BH740507	Putative fimbrial associated sortase-like protein	Cd	247	1e-20
BH740509	Putative flavoprotein phosphopantothenoylecysteine synthase/decarboxylase	Ce	379	1e-35
BH740513	5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Cd	343	9e-32
BH740512	Putative helicase	Cd	627	2e-64
BH740515	Hypothetical protein DIP1024	Cd	337	8e-31
BH740516	Hypothetical protein DIP1024	Cd	337	8e-31
BH740517	6-Phosphofructokinase	Cd	160	2e-10
BH740521	Isoleucyl-tRNA synthetase	Cd	211	2e-16
BH740522	Hypothetical protein DIP0262	Cd	284	7e-25
BH740526	Pyruvate kinase	Cd	296	7e-26
BH740525	Putative penicillin-binding (cell division related) protein	Cd	469	7e-46
BH740527	Putative succinate dehydrogenase cytochrome B subunit	Cd	336	2e-30
BH740530	Putative serine/threonine protein kinase	Cd	248	2e-20
BH740529	Putative serine/threonine protein kinase	Cd	248	2e-20
BH740532	Hypothetical protein DIP1024	Cd	190	1e-13
BH740531	Putative peptide transport system secreted protein	Cd	322	6e-29
BH740534	Putative succinate dehydrogenase cytochrome B subunit	Cd	308	2e-27
BH740533	Glycosyl transferase	Cg	235	1e-18
BH740535	Putative phospholipid biosynthesis	Cd	362	2e-33
BH740536	Hypothetical protein DIP1460	Cd	637	2e-65
BH740538	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cd	297	5e-26
BH740537	Hypothetical protein CE1118	Ce	313	7e-28
BH740539	Putative secreted protein	Cd	212	4e-16
BH740541	Hypothetical protein DIP1218	Cd	259	1e-21
BH740542	Hypothetical protein DIP2344	Cd	236	5e-19
BH740544	Putative mutase	Cd	160	4e-10
BH740545	Hypothetical protein DIP2060	Cd	310	1e-27
BH740546	30S ribosomal protein S1	Cg	186	3e-13
BH740551	Hypothetical protein DIP2095	Cd	169	3e-11
BH740550	Choline dehydrogenase	Cd	514	4e-51
BH740553	DNA repair protein	Cd	302	1e-26
BH740555	Hypothetical protein DIP1502	Cd	253	6e-21
BH740556	Hypothetical protein DIP1502	Cd	253	6e-21

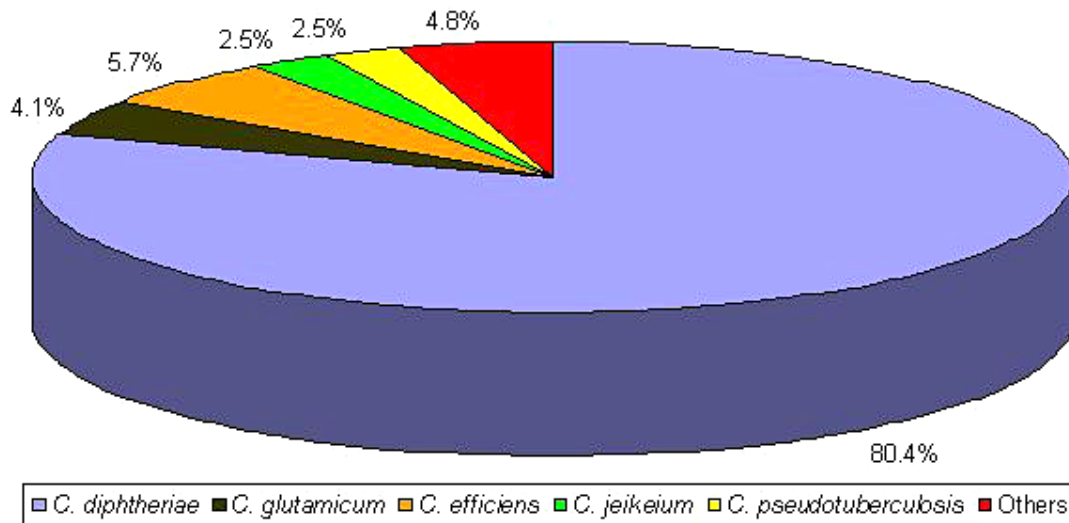
Continued on next page

Table 1. Continued.

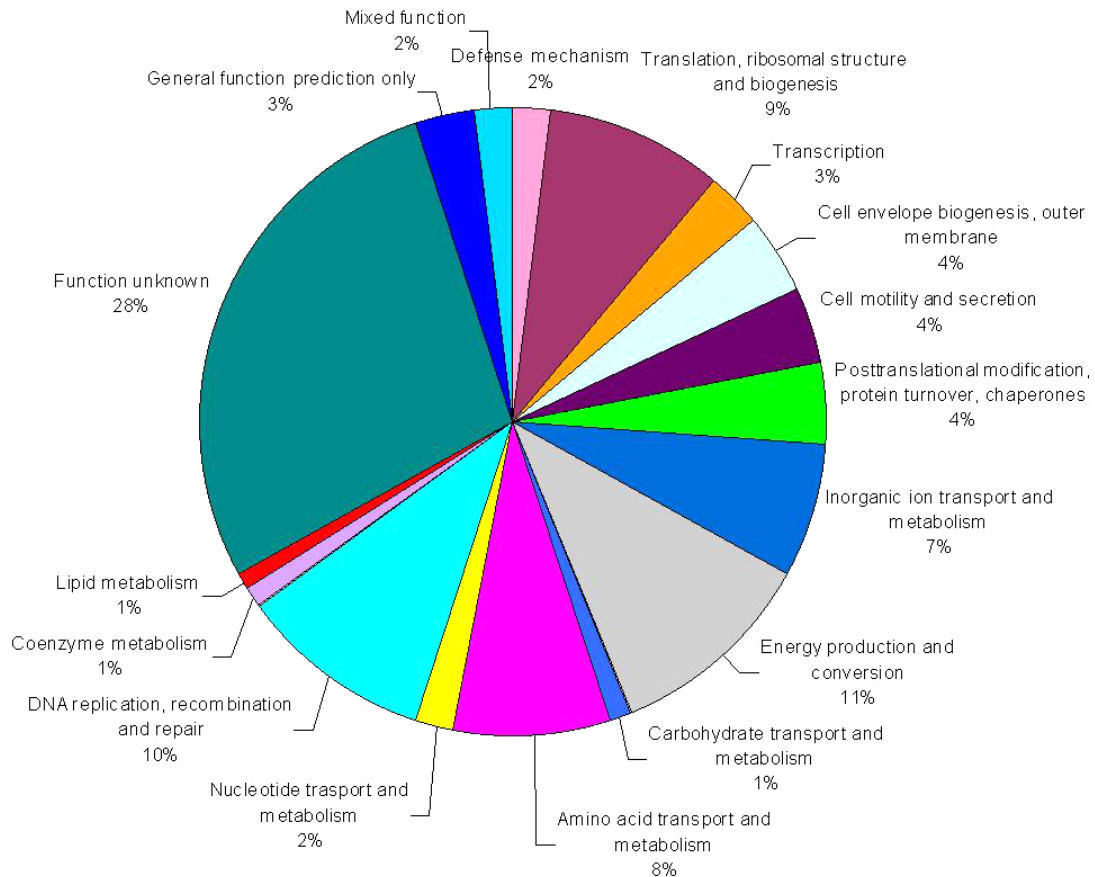
GSS Accession number	Function of best BLASTx hit	Source	Score	E-value
BH740557	Putative secreted protein	Cd	305	5e-27
BH740561	Putative ABC transport system secreted protein	Cd	517	2e-51
BH740564	Hypothetical protein CE1265	Ce	393	3e-37
BH740563	Hypothetical protein DIP1078	Cd	560	1e-56
BH740565	Putative oxidoreductase	Cd	203	4e-15
BH740566	Hypothetical protein DIP1157	Cd	307	3e-27
BH740567	Hypothetical protein DIP1539	Cd	235	7e-19
BH740568	RpoB	Cp	227	6e-18
BH740573	D-alanylalanine synthetase	Cd	173	1e-11
BH740574	Putative bacterioferritin	Cd	254	4e-21
BH740579	Putative prolyl oligopeptidase family protein	Cd	189	2e-13
BH740583	Putative secreted protein	Cd	183	1e-12
BH740586	Putative tetR family transcriptional regulator	Cd	159	2e-10
BH740587	Non-ribosomal peptide synthetase	Cg	220	2e-17
BH740597	Putative oxidoreductase	Cd	217	4e-17
BH740598	Putative thiosulfate sulfurtransferase	Cd	461	2e-45
BH740601	Hypothetical protein DIP0775	Cd	163	7e-11
BH740603	Predicted RNA-binding protein	Cg	191	9e-14
BH740605	Adenylyltransferase	Cd	229	4e-18
BH740612	Putative peptide transport system membrane protein	Cd	337	1e-30
BH740616	Hypothetical protein DIP1581	Cd	229	2e-18
BH740620	Putative two-component system sensor kinase protein	Cd	190	1e-13
BH740621	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Cd	277	1e-23
BH740622	Putative sugar ABC transport system membrane protein	Cd	322	6e-29
BH740628	Hypothetical protein DIP1797	Cd	365	6e-34
BH740632	Pyruvate dehydrogenase subunit E1	Cd	331	6e-30
BH740633	5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Cd	335	2e-30
BH740635	DNA gyrase subunit A	Cd	344	2e-31
BH740638	Hypothetical protein DIP0123	Cd	351	3e-32
BH740642	Putative RNA polymerase sigma factor	Cd	215	7e-17
BH740643	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase-like protein	Cd	434	4e-42
BH740644	Putative ABC transport system permease protein	Cd	168	3e-11
BH740646	Hypothetical protein DIP0149	Cd	160	4e-10
BH740647	Glutamyl-tRNA synthetase	Cd	364	9e-34

Cd = *Corynebacterium diphtheriae*; Ce = *C. efficiens*; Cg = *C. glutamicum*; Cj = *C. jeikeium*; Cp = *C. Pseudotuberculosis*; GSS = genomic survey sequence.

For an insight into the functional diversity of our random sequences, we compared our GSSs to the sequences present in the database and derived the functional classification associated with each protein. We found 123 GSSs that could be classified into 17 broad functional categories (Figure 3). Some GSSs were classified into more than one category and thus were included in the “mixed function” group. The largest fraction (28%) was placed in the function unknown group, which includes hypothetical proteins. Other important categories included sequences related to energy production and conversion (11%), DNA replication, recombination and repair (10%) and translation, ribosomal structure and biogenesis (9%).



**Figure 2.** Microorganisms that presented similarity with GSSs generated from the *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomic library.



**Figure 3.** Functional categories of *Corynebacterium pseudotuberculosis* GSSs according to their putative biological functions in the NCBI databases (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## CONCLUSIONS

Our libraries proved to be an important tool for mapping and genome assembly and could be used in a genome-sequencing project. The construction of this genomic library was part of the preparatory work for the Minas Gerais *C. pseudotuberculosis* (strain 1002) chromosome sequencing project, which will be initiated this year (2006).

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos - 01.04.760.00), and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil).

## REFERENCES

- Amemiya CT, Zhong TP, Silverman GA and Fishman MC (1999). The zebrafish, genomics and genetics. In: Methods in cell biology (Detrich W, Westerfield M and Zon L, eds.). Academic Press, New York, 235-258.
- Azevedo V, Alvarez E, Zumstein E, Damiani G, et al. (1993). An ordered collection of *Bacillus subtilis* DNA segments cloned in yeast artificial chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6047-6051.
- Battistoni F, Bartels D, Kaiser O, Marie Reamon-Buettner S, et al. (2005). Physical map of the *Azoarcus* sp. strain BH72 genome based on a bacterial artificial chromosome library as a platform for genome sequencing and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 249: 233-240.
- Birnboim HC and Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Brodin P, Eiglmeier K, Marmiesse M, Billault A, et al. (2002). Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect. Immun.* 70: 5568-5578.
- Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, et al. (1998). Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect. Immun.* 66: 2221-2229.
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gatus MT, Gouzy J, et al. (1999). A high-density physical map of *Sinorhizobium meliloti* 1021 chromosome derived from bacterial artificial chromosome library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9357-9362.
- Celestino PBS, Carvalho LR, Freitas LM and Dorella FA (2004). Update of microbial genome programs for bacteria and archaea. *Genet. Mol. Res.* 3: 421-431.
- Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, et al. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201-218.
- Feng Z, Qi J, Tsuge T, Oba Y, et al. (2005). Construction of a bacterial artificial chromosome library for a *myxobacterium* of the genus *Cystobacter* and characterization of an antibiotic biosynthetic gene cluster. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1372-1380.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, et al. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32: 643-655.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR and Hanahan D (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4645-4649.
- Kelley JM, Field CE, Craven MB, Bocskai D, et al. (1999). High throughput direct end sequencing of BAC clones. *Nucleic Acids Res.* 27: 1539-1546.
- Philipp WJ, Nair S, Guglielmi G, Lagranderie M, et al. (1996). Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. *Microbiology* 142 (Pt 11): 3135-3145.
- Redenbach M, Scheel J and Schmidt U (2000). Chromosome topology and genome size of selected actino-

- mycetes species. *Antonie Leeuwenhoek* 78: 227-235.
- Ripoll PJ, O'Sullivan DM, Edwards KJ and Rodgers M (2000). Technique for cloning and sequencing the ends of bacterial artificial chromosome inserts. *Biotechniques* 29: 271-276.
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, et al. (1999). Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet. Cell Genet.* 85: 205-211.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, et al. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8794-8797.
- Simon MI (1997). Dysfunctional genomics: BACs to the rescue. *Nat. Biotechnol.* 15: 839.
- Tauch A, Homann I, Mormann S, Ruberg S, et al. (2002). Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* 95: 25-38.
- Tauch A, Kaiser O, Hain T, Goesmann A, et al. (2005). Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* 187: 4671-4682.
- Tillett D and Neilan BA (1998). Small-scale preparation of the single-copy bacterial artificial chromosome vector pBeloBAC11. *Biotechniques* 24: 568-572.
- Walter J, Mangold M and Tannock GW (2005). Construction, analysis, and beta-glucanase screening of a bacterial artificial chromosome library from the large-bowel microbiota of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2347-2354.
- Woo SS, Jiang J, Gill BS, Paterson AH, et al. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* 22: 4922-4931.
- Zhang HB and Wing RA (1997). Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol. Biol.* 35: 115-127.
- Zhang HB, Woo SS and Wing RA (1996). BAC, YAC and cosmid library construction. In: *Plant gene isolation: principles and practice* (Foster GD and Twell D, eds.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, England, 75-99.
- Zhao S (2000). Human BAC ends. *Nucleic Acids Res.* 28: 129-132.



## 2007

### **- Publicação em periódicos:**

1. PACHECO, LGC; PENA, RR; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; BAHIA, RC; CARMINATI, R; FROTA, MNL; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; ALVES, FSF; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology, v. 56, p. 480-486, 2007 (em anexo).

### **- Capítulo de livro:**

1. DORELLA, FA; PACHECO, LGC; COELHO, KS; ROCHA, C; LOBO, FP; FRANCO, GR; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Seqüenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela rede genoma de Minas Gerais: impactos esperados na ovino e caprinocultura nacional. In: Márcia Rogéria de Almeida; Mauro Pires Moraes, Joaquín H. Patarroyo S.; Pedro Marcus p. Vidigal; Aluizio Borém. (Org.). Biotecnologia e Saúde Animal. Viçosa: Editora Folha de ViçosaF, 2007, p. 111-150.

### **- Participação em congressos (trabalhos):**

1. DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PACHECO, LGC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

2. PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Avaliação do papel dos fatores Sigma ECF da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse ambiental. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

3. SOARES, SC; SILVA, VD; DORELLA, FA; CAPANEMA, ER; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A. Análise da plasticidade genômica de linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* através de PCR2 (plasticity of chromosome revealed by long range polymerase chain reaction). In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

4. SILVA, VD; MORAES, PM; PACHECO, LGC; DORELLA, FA; CAPANEMA, ER; Pena, I; PROSDOCIMI, F; ORTEGA, JM; MEYER, R; Oliveira, GC; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Partial-genome sequence through GSS analyses and comparative genomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* the ethiological agent of caseous lymphadenitis disease. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

**- Trabalhos técnicos:**

1. AZEVEDO, V; DORELLA, FA; PACHECO, LGC; MIYOSHI, A. Certificação de uma linhagem de *Corynebacterim pseudotuberculosis* que será usada como vacina. 2007. Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda.
2. MIYOSHI, A; SEMORILE, L; HOLLMAN, A; DORELLA, FA. Herramientas Genéticas en bacterias Gram-positivas: clonado y expresión génica. 2007. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

## Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples

Luis G. C. Pacheco,<sup>1,2</sup> Roberta R. Pena,<sup>1</sup> Thiago L. P. Castro,<sup>1</sup> Fernanda A. Dorella,<sup>1</sup> Robson C. Bahia,<sup>3</sup> Renato Carminati,<sup>3</sup> Marcílio N. L. Frota,<sup>4</sup> Sérgio C. Oliveira,<sup>2,3</sup> Roberto Meyer,<sup>3</sup> Francisco S. F. Alves,<sup>5</sup> Anderson Miyoshi<sup>1</sup> and Vasco Azevedo<sup>1</sup>

Correspondence  
Vasco Azevedo  
vasco@icb.ufmg.br

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Bio-Interação, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, Brazil

<sup>4</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral – CE, Brazil

<sup>5</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Sobral – CE, Brazil

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the aetiological agent of caseous lymphadenitis (CLA), a debilitating disease of sheep and goats. Accurate diagnosis of CLA primarily relies on microbiological examination, followed by biochemical identification of isolates. In an effort to facilitate *C. pseudotuberculosis* detection, a multiplex PCR (mPCR) assay was developed targeting three genes of this bacterium: the 16S rRNA gene, *rpoB* and *pld*. This method allowed efficient identification of 40 isolates of this bacterium that had been identified previously by biochemical testing. Analysis of taxonomically related species did not generate the *C. pseudotuberculosis* mPCR amplification profile, thereby demonstrating the assay's specificity. As little as 1 pg of *C. pseudotuberculosis* genomic DNA was detected by this mPCR assay, demonstrating the sensitivity of the method. The detection limit in clinical samples was estimated to be 10<sup>3</sup> c.f.u. *C. pseudotuberculosis* could be detected directly in pus samples from infected sheep and goats ( $n=56$ ) with a high diagnostic sensitivity (94.6%). The developed assay significantly improves rapid *C. pseudotuberculosis* detection and could supersede bacteriological culture for microbiological and epidemiological diagnosis of CLA.

Received 11 October 2006  
Accepted 23 November 2006

### INTRODUCTION

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a mycolic acid-containing, facultative intracellular actinomycete associated with the development of abscesses in a variety of mammalian hosts (Songer *et al.*, 1988; Peel *et al.*, 1997; Dorella *et al.*, 2006). This Gram-positive bacterium most commonly causes ulcerative lymphangitis in horses and caseous lymphadenitis (CLA) in small ruminants (Biberstein *et al.*, 1971; Williamson, 2001). The latter is a

chronic disease of sheep and goats, mainly characterized by the formation of suppurative abscesses in superficial and internal lymph nodes (Kuria *et al.*, 2001; Williamson, 2001). CLA is distributed globally and causes important economic losses for ovine and caprine husbandries, due to reduced wool, meat and milk yields, culling of affected animals and condemnation of carcasses and skins in slaughterhouses (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006).

Once established in a herd or flock, CLA eradication is problematic due to the inefficacy of antimicrobial therapy (Piontkowski & Shivvers, 1998; Stanford *et al.*, 1998; Williamson, 2001). The most reliable control strategy for this disease involves vaccinating livestock and identifying and removing infected animals (Brown *et al.*, 1986; Paton

Abbreviations: CLA, caseous lymphadenitis; mPCR, multiplex PCR; PLD, phospholipase D.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the *rpoB* gene sequence of *Arcanobacterium pyogenes* is DQ680032.

*et al.*, 2003). However, this approach is hindered by limitations in current diagnostic techniques (Williamson, 2001; Menzies *et al.*, 2004; Dorella *et al.*, 2006).

Many serological tests have been proposed for CLA diagnosis, including a complement fixation test (Shigidi, 1979), synergistic haemolysis-inhibition test (Brown *et al.*, 1987), microagglutination assay (Menzies & Muckle, 1989) and *C. pseudotuberculosis* phospholipase D (PLD) antigen-based ELISA (Dercksen *et al.*, 2000). Although these tests may be of great value for the detection of subclinically infected animals, most present drawbacks, including low sensitivity, poor specificity and an inability to distinguish between previously exposed animals and those still harbouring the pathogen. Thus it is questionable whether such techniques should be employed to orient culling programmes (Williamson, 2001; Çetinkaya *et al.*, 2002).

Accurate CLA diagnosis is based primarily upon clinical observations (external abscesses) and the identification of *C. pseudotuberculosis* by phenotypic and biochemical tests; this is important to differentiate this bacterium from other abscess-inducing pathogenic agents, such as *Arcanobacterium pyogenes* or *Pasteurella multocida* (Dercksen *et al.*, 2000; Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006).

A 16S rRNA gene-based PCR assay has been developed to identify *C. pseudotuberculosis* isolates (Çetinkaya *et al.*, 2002). Although this assay was useful for estimating the prevalence of CLA in the animals studied, it presented some limitations: (i) it was dependent on bacterial culture; and (ii) it was not specific enough to distinguish *C. pseudotuberculosis* from *Corynebacterium ulcerans* (Çetinkaya *et al.*, 2002).

In order to improve *C. pseudotuberculosis* detection by PCR, we developed a multiplex PCR (mPCR) assay and adapted a protocol to extract bacterial genomic DNA directly from clinical samples. Amplification of multiple loci in a single reaction through mPCR is a powerful and widely used tool for the rapid and specific identification of pathogenic bacteria (Wadowsky *et al.*, 1996; Halbert *et al.*, 2005; O'Halloran & Cafferkey, 2005; Persson & Olsen, 2005). Our mPCR targeted three *C. pseudotuberculosis* genes: the 16S rRNA gene, the gene of choice for most microbial taxonomy studies (Çetinkaya *et al.*, 2002; Khamis *et al.*, 2005); *rpoB*, the RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene, currently used to study phylogenetic relationships in the genera *Corynebacterium* and *Mycobacterium* (Khamis *et al.*, 2004, 2005; Dorella *et al.*, 2006); and *pld*, which encodes the exotoxin PLD, a sphingomyelinase implicated in the virulence of *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum* (McNamara *et al.*, 1995). This mPCR enabled specific identification of *C. pseudotuberculosis* isolates in culture and direct detection in pus samples from CLA-affected animals.

## METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. A total of 40 caprine isolates

of *C. pseudotuberculosis* were obtained from different sources. One type strain of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* (strain CIP 102968<sup>T</sup>) and 13 strains of genetically or morphologically related bacteria were also used in the experiments.

Bacteria were grown routinely in brain heart infusion broth (BHI; Oxoid) or on 1.5% (w/v) BHI bacteriological agar plates at 37 °C for 48–72 h. Tween 80 was added to the medium at a final concentration of 1% (v/v) for the *Corynebacterium bovis* strain.

**Clinical specimens.** Fifty-six pus samples were collected aseptically from abscessed lymph nodes of naturally infected sheep ( $n=12$ ) and goats ( $n=44$ ) found in two CLA-endemic areas of Brazil. Microbiological examination, followed by biochemical identification, was used as a gold standard to confirm infection with *C. pseudotuberculosis*. In brief, bacteriological cultures were made of pus specimens and the resultant *C. pseudotuberculosis*-resembling colonies that stained Gram-positive were tested further for biochemical properties (glucose fermentation, urease and catalase) (Smibert & Krieg, 1994; Dercksen *et al.*, 2000). Synergistic haemolysis with *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and inhibition of  $\beta$ -haemolysis by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were also evaluated (Smibert & Krieg, 1994; Dercksen *et al.*, 2000). Species identification was confirmed using the API Coryne battery (bioMérieux).

Blood samples were taken from confirmed *C. pseudotuberculosis*-infected animals ( $n=19$ ) and from healthy animals ( $n=20$ ) using the Vacutainer blood collection system (Becton Dickinson).

## DNA isolation

Two different protocols were adapted for extracting DNA from pure bacterial cultures and clinical samples.

**(i) Bacterial cultures.** Chromosomal DNA extraction was performed in the same manner for all bacterial strains. A 20 ml 48–72 h culture was centrifuged at 4 °C and 2000 g for 20 min. Cell pellets were resuspended in 1 ml Tris/EDTA/RNase [10 mM Tris/HCl (pH 7.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 300 mM NaCl, 50  $\mu$ g RNase A ml<sup>-1</sup>] and centrifuged again under the same conditions. Supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 1 ml TE/lysozyme [25 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaCl, 10 mg lysozyme ml<sup>-1</sup>]. Samples were then incubated at 37 °C for 30 min; 30  $\mu$ l 30% (w/v) sodium *N*-lauroyl-sarcosine (sarcosyl) was added and the mixture was incubated for 20 min at 65 °C, followed by incubation for 5 min at 4 °C. DNA was purified using phenol/chloroform/isoamyl alcohol and precipitated with ethanol (Sambrook *et al.*, 1989). DNA concentrations were determined spectrophotometrically.

**(ii) Clinical samples.** A DNA extraction protocol previously described for clinical samples from tuberculosis patients (Honoré-Bouakline *et al.*, 2003) was adapted for use in this study. Briefly, 100 mg pus or the pellet of a 2 ml blood sample was resuspended in 1 ml TE/lysozyme. Samples were incubated for 1 h at 37 °C; 20  $\mu$ l proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>; Invitrogen) was added, followed by incubation for 2 h at 56 °C. Samples were divided into two aliquots of 500  $\mu$ l, and 25  $\mu$ l 30% (w/v) sarcosyl was added to each; mixtures were incubated for 20 min at 65 °C and then for 5 min at 4 °C. DNA was purified and precipitated as described above.

**Primers and mPCR conditions.** The oligonucleotide primers used in this study are listed in Table 2. Primers targeting the 16S rRNA and *rpoB* genes of *C. pseudotuberculosis* were obtained from previously published work (Çetinkaya *et al.*, 2002; Khamis *et al.*, 2004). Primers targeting the *pld* gene were designed by aligning the *pld* nucleotide sequences of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans*

**Table 1.** Bacterial strains and field isolates of *C. pseudotuberculosis* used in this study

GUH, Ghent University Hospital, Belgium (DL and HJ: initials of donators Devrise Luc and Hommez Joseph); UFBA, Collection of Micro-organisms of Universidade Federal da Bahia, Brazil; NCTC, National Collection of Type Cultures, UK; IOC, Collection of Micro-organisms of Instituto Oswaldo Cruz, Brazil; CIP, Collection of the Institut Pasteur, France; ATCC, American Type Culture Collection, USA.

Species	Source/strain designation
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	GUH HJ 26 BA224.11
<i>A. pyogenes</i> -like	GUH HJ 51 B
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	GUH HJ 08 14218 LV
<i>C. bovis</i>	GUH DL BOV25
<i>C. diphtheriae</i>	ATCC 13812
<i>C. jeikeium</i>	NCTC K411
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	CIP 5297
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i> (n=37)*	VD21; VD23; VD27; VD28; VD33; VD36; VD37; VD38; VD41; VD42; VD43; VD44; VD45; VD46; VD48; VD50; VD52; VD53; VD54; VD55; VD56; VD57; VD58; VD59; VD60; VD61; VD62; VD63; VD99; 01; 05; 08; 09; 11; 12; 21; 217
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	UFBA T1
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	UFBA 1002
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	GUH HJ ULCC06.334,4
<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	CIP 102968 <sup>T</sup>
<i>C. renale</i>	CIP 103421 <sup>T</sup>
<i>C. ulcerans</i>	GUH HJ ULCA3.675,1
<i>C. ulcerans</i>	GUH HJ 01 BM3796.3
<i>C. ulcerans</i>	GUH HJ 02 MN 675.3
<i>C. ulcerans</i>	GUH HJ ULCB12.735,2
<i>Pasteurella multocida</i>	IOC

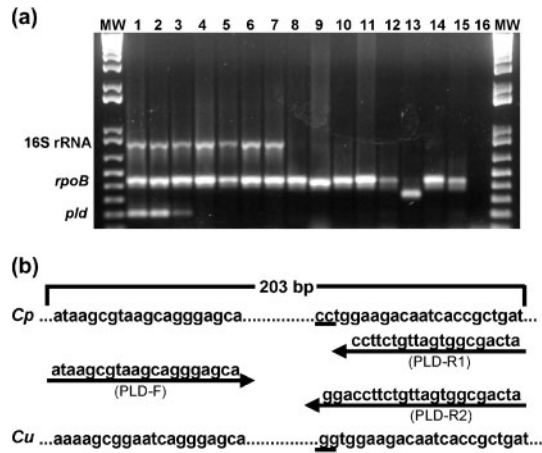
\*Caprine field isolates; obtained from Universidade Federal da Bahia, Brazil.

(GenBank accession nos L16587 and L16585); the reverse primer PLD-R1 was used in association with the forward primer PLD-F to amplify the *pld* genes of both bacteria, whilst primer PLD-R2 excluded *C. ulcerans* (see Fig. 1b). A primer pair targeting the mitochondrial 12S rRNA genes of *Capra hircus* and *Ovis aries* (GenBank accession nos AJ490504 and AJ490503) was designed to function as an internal amplification control for the mPCRs performed with DNA extracted directly from clinical samples of CLA. This amplification control allowed identification of samples that possessed factors inhibitory for the mPCR assay (Hoorfar *et al.*, 2004).

Multiplex PCRs were performed in a final reaction volume of 10 µl containing 1.5 U AccuPrime *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1 × PCR Buffer II [200 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, AccuPrime protein (Invitrogen), 10% glycerol] and 2 µM of each of the primers 16S-F/16S-R, C2700F/C3130R and PLD-F/PLD-R2. For mPCRs performed with DNA extracted from clinical samples, primers 12S-F/12S-R were added to the reaction mixture at 0.2 µM each. The template concentration was approximately 10 ng DNA extracted from cultured *C. pseudotuberculosis* or from clinical specimens. Where necessary, serial twofold dilutions (1:2, 1:4 and 1:8)

**Table 2.** List of oligonucleotide primers used in this study

Target gene	Primers	Sequence (5'→3')	Length of PCR products (bp)	Source/reference
16S rRNA gene	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816	Çetinkaya <i>et al.</i> (2002)
	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGAT		
<i>rpoB</i>	C2700F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446	Khamis <i>et al.</i> (2004)
	C3130R	TCCATTTCCGCCGAAGCGCTG		
<i>pld</i>	PLD-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203	This work
	PLD-R1	ATCAGCGGTGATTGTCTTCC		
	PLD-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG		
12S rRNA gene	12S-F	CCAGCCACCGGGTCATACG	274	This work
	12S-R	TGAGTTTCGGGCTGTTGCCG		



**Fig. 1.** Analytical specificity of the mPCR assay. (a) Amplification profiles of bacteria genetically or morphologically related to *C. pseudotuberculosis*. Lanes 1–15 show reactions with DNA from the following bacterial strains: 1 and 2, *C. pseudotuberculosis ovis* strains CIP 102968<sup>T</sup> and 1002; 3, *C. pseudotuberculosis equi* CIP 5297; 4–7, *C. ulcerans* strains ULCA3.675,1, HJ 01 BM3796.3, HJ 02 MN 675.3 and ULCB12.735,2; 8, *C. diphtheriae* ATCC 13812; 9, *Corynebacterium amycolatum* HJ 08 14218 LV; 10, *Corynebacterium renale* CIP 103421<sup>T</sup>; 11, *C. bovis* DL BOV25; 12, *Corynebacterium jeikeium* K411; 13, *Arcanobacterium pyogenes* HJ 26 BA224.11; 14, *A. pyogenes*-like HJ 51 B; 15, *Pasteurella multocida*. Lane 16, negative control (reaction without template DNA). MW, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (b) Schematic representation of primer-annealing sites in the *pld* genes of *C. pseudotuberculosis* (*Cp*) and *C. ulcerans* (*Cu*). The underlined nucleotides indicate positions of mismatch between the two aligned gene sequences (see text for details).

were performed on samples to dilute inhibitory components (Honoré-Bouakline *et al.*, 2003). Reactions were carried out in a thermal cycler (PTC-100; MJ Research) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min; 40 cycles of 95 °C for 1 min, 58 °C for 40 s and 68 °C for 1 min 30 s; final extension at 68 °C for 7 min. The amplified products were resolved by electrophoresis on 1.0 % (w/v) agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

**Sequencing of singleplex PCR products.** In order to confirm the mPCR results, ten randomly chosen isolates were tested further in singleplex PCR assays with the three *C. pseudotuberculosis*-specific primer pairs. PCR products were precipitated with 15 % (w/v) polyethylene glycol (Kusukawa *et al.*, 1990) and sequenced using the DYEnamic ET Dye Terminator kit (Amersham Biosciences), according to the manufacturer’s instructions. The sequences were compared with previously published 16S rRNA (GenBank accession nos X81916, X81907 and X84255), *rpoB* (GenBank accession no. AY492239) and *pld* (GenBank accession nos L16586 and L16587) *C. pseudotuberculosis* gene sequences, by searching for similarity using BLAST-N (Altschul *et al.*, 1990).

**Analytical specificity and sensitivity.** To evaluate the specificity of the mPCR assay, reactions were performed with genomic DNA extracted from bacterial strains taxonomically similar to *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* (Table 1). Serial tenfold dilutions of DNA from

*C. pseudotuberculosis* type strain CIP 102968<sup>T</sup>, ranging from 10 to 0.0001 ng DNA per reaction, were used to test the sensitivity of the method.

To evaluate the assay’s detection limit, blood samples from goats that did not present clinical symptoms of CLA, and which were negative in ELISA tests (performed according to Paule *et al.*, 2003), were seeded with 10<sup>1</sup>–10<sup>6</sup> c.f.u. of *C. pseudotuberculosis*.

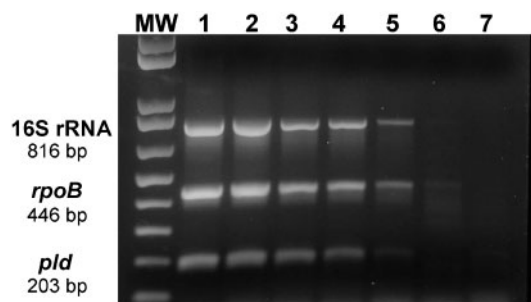
**Statistical analysis.** An analysis to evaluate differences in the sensitivity of the mPCR assay between samples from sheep versus goats was performed with a  $\chi^2$  test, using the STATISTICA software package (StatSoft).

## RESULTS

### Specificity and sensitivity of the mPCR assay

Purified genomic DNAs were used to evaluate the sensitivity and specificity of the mPCR assay. When tested with DNA from bacterial strains taxonomically related to *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* (Table 1), only *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* CIP 5297 yielded a similar mPCR profile, with the 816, 446 and 203 bp amplicons corresponding to the 16S rRNA, *rpoB* and *pld* genes, respectively (Fig. 1a). As in a previous study (Khamis *et al.*, 2004), all of the corynebacteria species that we tested generated an amplicon of ~446 bp, corresponding to the *rpoB* gene (Fig. 1a). As expected, the *pld* gene product was not detected in any of the four *C. ulcerans* strains (Fig. 1a, lanes 4–7), illustrating the ability of the mPCR assay to differentiate this bacterium from *C. pseudotuberculosis*. Moreover, two other pathogenic bacteria associated with the formation of abscesses in small ruminants, *A. pyogenes* and *P. multocida*, were clearly distinguished (Fig. 1a). The ~300 bp product generated by amplification of *A. pyogenes* genomic DNA was sequenced and assigned as the *rpoB* gene following a search for homology in GenBank using BLAST-N (data not shown).

To determine the sensitivity of the assay, reactions were performed with serial tenfold dilutions of purified *C. pseudotuberculosis* CIP 102968<sup>T</sup> DNA. The mPCR method



**Fig. 2.** Analytical sensitivity of the mPCR assay. Lanes 1–6, mPCR with serial tenfold dilutions of *C. pseudotuberculosis* CIP 102968<sup>T</sup> genomic DNA, as follows: 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001 ng. Lane 7, negative control (reaction without template DNA). MW, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

was able to detect bacterial DNA at concentrations ranging from 10 to 0.001 ng per reaction (Fig. 2).

To assess the detection limit of the assay in clinical specimens, blood samples of healthy animals were spiked with tenfold dilutions of a pure culture of *C. pseudotuberculosis* CIP 102968<sup>T</sup> and the mixtures were processed using the entire DNA extraction protocol. Amplification products were detected in reactions containing  $10^3$ – $10^6$  c.f.u. *C. pseudotuberculosis* (ml sample)<sup>-1</sup> (data not shown).

### Identification of bacterial isolates

The characteristic mPCR amplification profile was obtained for all 40 *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* field isolates tested (Table 1). Fig. 3(a) shows the mPCR profiles of ten randomly chosen *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* field isolates.

Identification of the ten isolates was confirmed by sequencing each of the three amplicons generated, followed by a search for similar sequences using BLAST-N (data not shown).

### Direct detection of *C. pseudotuberculosis* in clinical samples by mPCR

Pus samples were collected from the lymph nodes of CLA-affected sheep and goats and DNA was extracted directly from these specimens using our protocol (see Methods). A bacteriological culture was prepared from the samples as a gold standard to confirm infection by *C. pseudotuberculosis*. The mPCR protocol was performed as described for purified

bacterial DNA; however, a non-competitive internal amplification control (12S rDNA; see Methods) was included in these reactions in order to allow differentiation between inhibited reactions, i.e. those in which there was no amplification of the internal control, and reactions in which the mPCR yielded a negative result (Hoorfar *et al.*, 2004). Typical mPCR profiles of clinical samples are shown in Fig. 3(b).

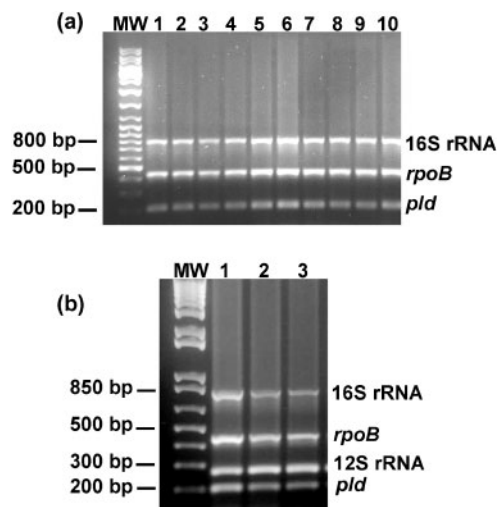
Most of the undiluted samples were inhibitory for the mPCR assay, but more than 52 % yielded detectable results at a 1 : 2 dilution and ~45 % showed amplification at a 1 : 4 dilution, whilst only 3 % showed amplification at a 1 : 8 dilution. The proportions of samples positive in the mPCR assay were not significantly different when comparing samples of sheep versus goats ( $P=0.60$ ). Table 3 summarizes the results obtained for pus samples.

The ability of the mPCR assay to detect *C. pseudotuberculosis* in blood samples from confirmed CLA-affected animals was also evaluated; however, none of the 19 blood samples that we tested yielded a positive result (data not shown).

## DISCUSSION

CLA remains a cause of concern for sheep and goat producers worldwide (Baird, 1997; Williamson, 2001; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006). Due to the high transmission rate of its aetiological agent, *C. pseudotuberculosis*, within a herd or flock, some authors suggest the culling of any animal from which this bacterium has been cultured as a means of controlling spread of the disease (Baird, 1997; Williamson, 2001). As microbiological and biochemical methods are not always straightforward, the development of a rapid and specific diagnostic tool is imperative for the control of CLA (Çetinkaya *et al.*, 2002).

The only previously reported molecular method employed for specific identification of *C. pseudotuberculosis* isolated from pus samples of CLA-affected animals, based on the amplification of a 16S rRNA gene fragment (Çetinkaya *et al.*, 2002), has two major drawbacks: (i) dependence on bacterial culture; and (ii) an inability to distinguish the bacterium *C. ulcerans*.



**Fig. 3.** Reproducibility of the mPCR assay. (a) Lanes 1–10, mPCR amplification profiles of 10 of the 40 field isolates of *C. pseudotuberculosis*. MW, GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). (b) Lanes 1–3, direct detection of *C. pseudotuberculosis* in pus samples of CLA-affected animals. MW, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

**Table 3.** Results of direct detection of *C. pseudotuberculosis* in pus samples of CLA-affected animals using the mPCR assay

Pus samples*	mPCR result		Sensitivity (%)
	Positive	Negative	
Sheep ( $n=12$ )	11	1	91.7
Goats ( $n=44$ )	42	2	95.4
Total ( $n=56$ )	53	3	94.6

\*Samples positive for *C. pseudotuberculosis* in bacteriological culture (gold standard).

Our mPCR assay was specific enough to differentiate *C. pseudotuberculosis* from *C. ulcerans* (Fig. 1a). These two bacteria have been reported to possess 99.7% similarity between their 16S rRNA genes and 93.6% between their *rpoB* genes (Riegel *et al.*, 1995; Khamis *et al.*, 2004); most of their biochemical properties are similar and both may eventually produce diphtheric toxin (Riegel *et al.*, 1995; DeWinter *et al.*, 2005). The high genomic similarity may explain the inability of a previously published study to differentiate these two bacteria by PCR (Çetinkaya *et al.*, 2002). As *C. ulcerans* is also a PLD producer, the reverse primer used to amplify the *pld* gene in our study was designed so that it possessed a mismatch in its 3' end (two Gs instead of two Cs) (Fig. 1b), allowing differentiation from *C. pseudotuberculosis* due to the absence of the 203 bp amplicon.

Although *C. ulcerans* is primarily recognized as a veterinary pathogen, there has been a marked increase in the number of human infections (DeWinter *et al.*, 2005; De Zoysa *et al.*, 2005) and it appears that domestic cats and dogs can be potential reservoirs (De Zoysa *et al.*, 2005). In this context, our mPCR would be able to identify bacteria collected from the nasal discharge of domestic animals and could differentiate bacteria cultured from samples from diphtheria patients by using the primer pair PLD-F/PLD-R1, which allows amplification of the *pld* gene of *C. ulcerans* (see Fig. 1b).

Çetinkaya *et al.* (2002) reported a weaker amplification of the 816 bp 16S rRNA gene amplicon in biovar *equi* of *C. pseudotuberculosis* when compared with that of biovar *ovis*. This result was attributed to a mismatch (an A instead of a G) five bases from the 5' end of the forward primer used (16S-F; Table 2). However, this result was not reproducible under the conditions used in our study. We propose that amplification of the 16S rRNA gene using primers 16S-F/16S-R is not sufficient to differentiate the two biovars of *C. pseudotuberculosis*. It is interesting that infection of small ruminants with biovar *equi* is not known to occur (Spier *et al.*, 2004).

The mPCR assay was able to confirm the identification of 40 *C. pseudotuberculosis* field isolates and reliably detected this bacterium in a reaction mixture containing as little as 0.001 ng of genomic DNA, illustrating its reproducibility and high sensitivity.

A DNA extraction protocol was adapted to recover bacterial genomic DNA directly from clinical samples of CLA-affected animals. This strategy offers advantages over bacteriological culture, including reduced time of analysis and the ability to detect unviable bacteria. The detection limit of the goat blood spiking experiment was  $10^3$  c.f.u. *C. pseudotuberculosis* (ml sample)<sup>-1</sup>. However, this value may underestimate the number of viable organisms, as intracellular bacteria such as *C. pseudotuberculosis* and *R. equi* have a tendency to clump when cultured (Harrington *et al.*, 2005). A detection limit above  $10^3$  c.f.u. (ml sample)<sup>-1</sup> would help explain the inability of the mPCR assay to detect *C. pseudotuberculosis* in blood samples from infected sheep and goats.

On the other hand, the mPCR efficiently detected this bacterium in a high proportion (94.6%) of confirmed CLA-infected pus samples. In contrast to serological CLA testing (Menzies & Muckle, 1989; Dercksen *et al.*, 2000), the mPCR sensitivity was the same for both sheep and goats (Table 3).

As our mPCR assay provides an efficient, accurate, rapid and reproducible method for the identification of cultured *C. pseudotuberculosis* and its direct detection in pus samples, we propose that it may be used instead of bacteriological culture as a confirmatory CLA test.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) and FINEP # 01.04.0760.00 (Financiadora de Estudos e Projetos – Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil). We wish to thank Dr Mario Vaneechoutte and Dr Andreas Tauch for providing bacterial strains and Frances Bolt for critical revision of the manuscript. We also acknowledge technical assistance provided by technician Kátia Moraes and by the Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (EMBRAPA Caprinos, Brasil).

## REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Baird, G. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet Rec* 140, 611.
- Biberstein, E. L., Knight, H. D. & Jang, S. (1971). Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Rec* 89, 691–692.
- Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L. & Morse, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res* 47, 1116–1119.
- Brown, C. C., Olander, H. J. & Alves, S. F. (1987). Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Can J Vet Res* 51, 46–49.
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T. & Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88, 75–83.
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., van Maanen, K., Bode, C. F., Baird, G. & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 75, 167–175.
- DeWinter, L. M., Bernard, K. A. & Romney, M. G. (2005). Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reported criteria for cases of diphtheria. *J Clin Microbiol* 43, 3447–3449.
- De Zoysa, A., Hawkey, P. M., Engler, K., George, R., Mann, G., Reilly, W., Taylor, D. & Efstratiou, A. (2005). Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 43, 4377–4381.
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A. & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiol-



ogy, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* **37**, 201–218.

**Halbert, N. D., Reitzel, R. A., Martens, R. J. & Cohen, N. D. (2005).** Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. *Am J Vet Res* **66**, 1380–1385.

**Harrington, J. R., Golding, M. C., Martens, R. J., Halbert, N. D. & Cohen, N. D. (2005).** Evaluation of real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*. *Am J Vet Res* **66**, 755–761.

**Honoré-Bouakline, S., Vincensini, J. P., Giacuzzo, V., Lagrange, P. H. & Herrmann, J. L. (2003).** Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* **41**, 2323–2329.

**Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. & Fach, P. (2004).** Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol* **42**, 1863–1868.

**Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2004).** *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* **42**, 3925–3931.

**Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2005).** Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* **43**, 1934–1936.

**Kuria, J. K. N., Mbuthia, P. G., Kang'ethe, E. K. & Wahome, R. G. (2001).** Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet Res Commun* **25**, 89–97.

**Kusukawa, N., Uemori, T., Asada, K. & Kato, I. (1990).** Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**, 66–68.

**McNamara, P. J., Cuevas, W. A. & Songer, J. G. (1995).** Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* **156**, 113–118.

**Menzies, P. I. & Muckle, C. A. (1989).** The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Can J Vet Res* **53**, 313–318.

**Menzies, P. I., Hwang, Y.-T. & Prescott, J. F. (2004).** Comparison of an interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Vet Microbiol* **100**, 129–137.

**O'Halloran, D. M. & Cafferkey, M. T. (2005).** Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. *J Clin Microbiol* **43**, 3487–3490.

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

**Paule, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L. C., Moura-Costa, L. F., Freire, S. M., Nascimento, I. & other authors (2003).** Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immunol Immunopathol* **96**, 129–139.

**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* **24**, 185–191.

**Persson, S. & Olsen, K. E. P. (2005).** Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly in stool samples. *J Med Microbiol* **54**, 1043–1047.

**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* **212**, 1765–1768.

**Riegel, P., Ruimy, R., de Briel, D., Prévost, G., Jehl, F., Christen, R. & Monteil, H. (1995).** Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 271–276.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Shigidi, M. T. (1979).** A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Br Vet J* **135**, 172–177.

**Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994).** Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

**Songer, J. G., Beckenbach, K., Marshall, M. M., Olson, G. B. & Kelley, L. (1988).** Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res* **49**, 223–226.

**Spier, S. J., Leutenegger, C. M., Carroll, S. P., Loye, J. E., Pusterla, J. B., Carpenter, T. E., Mihalyi, J. E. & Madigan, J. E. (2004).** Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Am J Vet Res* **65**, 829–834.

**Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C. & Audibert, F. (1998).** The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can J Vet Res* **62**, 38–43.

**Wadowsky, R. M., Michaels, R. H., Libert, T., Kingsley, L. A. & Ehrlich, G. D. (1996).** Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol* **34**, 2645–2649.

**Williamson, L. H. (2001).** Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **17**, 359–371.

## 2008

### **- Publicação em periódicos:**

1. D'AFONSECA, V; MORAES, PM; DORELLA, FA; Pacheco, LGC; MEYER, R; PORTELA, RW; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. Genetics and Molecular Research, v. 7, p. 252-260, 2008 (em anexo).
2. PACHECO, LGC; MATI, V; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; DEMELO, A; AZEVEDO, V. Oral immunization with *Salmonella* harboring a Sm14-based DNA vaccine does not protect mice against *Schistosoma mansoni* infection. Parasitology International, v. 57, p. 506-508, 2008 (em anexo).

### **- Trabalho em revista/magazine:**

1. DORELLA, FA; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Vacinas e a Erradicação da LC. Microbiologia in foco (Sociedade Brasileira de Microbiologia), v. 5, p. 26-31, 2008.

### **- Participação em congressos (trabalhos):**

1. DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; Pacheco, LGC; SEYFFERT, N; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; CASTRO, TLP; SOARES, SC; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Analysis of vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; Pacheco, LGC; SEYFFERT, N; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; Castro, TLP; SOARES, SC; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.
3. DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; Pacheco, LGC; SEYFFERT, N; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; Castro, TLP; SOARES, SC; OLIVEIRA, SC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. In: 26<sup>a</sup> Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.
4. SOARES, SC; PINTO, AC; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PACHECO, LGC; SEYFFERT, N; D'AFONSECA, V; Castro, TLP; HIRATA JR, R; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A. Plasticidade genômica de *Corynebacterium diphtheriae*: implicações na virulência. In: 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.
- 5 CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; DORELLA, FA; Pacheco, LGC; SOARES, SC; CASTRO, TLP; CASTRO, T; D'AFONSECA, V; SEYFFERT, N; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO,

V. Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a identificação de promotores através da expressão de gfp. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

6 SILVA W; SEYFFERT, N; SANTOS, BMN; PRUDENCIO, CR; PACHECO, L; CASTRO, TLP; SOARES, SC; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; PORTELA, RW; MAHECHA, GAB; GOULART, LR; MEYER, R; MIYOSHI, A; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C AZEVEDO, V. Identificação de epítomos da superfície de fagos para o imunodiagnóstico da LC em caprinos. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

7 SEYFFERT, N; PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; SOARES, SC; MORAES, PM; D'AFONSECA, V; CARVALHO, MAR; FARIAS, LM; OLIVEIRA, SC; PIMENTA, AMC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Integração da genômica e proteômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o imunodiagnóstico da LC. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

8. PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; SEYFFERT, N; DORELLA, FA; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; SOARES, SC; BUCKER, D; MORAES, PM; CERQUEIRA, PG; SILVA W; RIBEIRO, D; MEYER, R; MIYOSHI, A; OLIVEIRA, SC; AZEVEDO, V. Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

9. SOARES, SC; PINTO, AC; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PACHECO, LGC; SEYFFERT, N; D'AFONSECA, V; CASTRO, TLP; HIRATA JR, R; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A. Análise das ilhas de patogenicidade de *Corynebacterium diphtheriae* por PCR2 (plasticity of chromosome revealed by long range-polymerase chain reaction). In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

10. PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; SEYFFERT, N; DORELLA, FA; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; SOARES, SC; BUCKER, D; MORAES, PM; CERQUEIRA, PG; SILVA W; RIBEIRO, D; SANTOS, SG; FARIAS, LM; CARVALHO, MAR; PIMENTA, AMC; MEYER, R; MIYOSHI, A; OLIVEIRA, SC; AZEVEDO, V. Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

11. CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; DORELLA, FA; PACHECO, LGC; SOARES, SC; CASTRO, TLP; D'AFONSECA, V; SEYFFERT, N; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a identificação de promotores através da expressão do gfp. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

12. SEYFFERT, N; PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; SOARES, SC; SANTOS, SG; D'AFONSECA, V; CARVALHO, MAR; FARIAS,

LM; OLIVEIRA, SC; PIMENTA, AMC; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Análise imunoproteômica do secretoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para fins diagnósticos. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

13. SILVA W; SEYFFERT, N; SANTOS, BMN; PRUDENCIO, CR; PACHECO, LGC; CASTRO, TLP; DORELLA, FA; CERQUEIRA, PG; PINTO, AC; D'AFONSECA, V; PORTELA, RW; SOARES, SC; MAHECHA, GAB; GOULART, LR; MEYER, R; MIYOSHI, A; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C; AZEVEDO, V. Uso de phage display na seleção de peptídeos para o diagnóstico da LC em pequenos ruminantes. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

14. D'AFONSECA, V; MORAES, PM; DORELLA, FA; PACHECO, LGC; ALMEIDA, SS; PINTO, AC; SANTOS, AR; CERQUEIRA, PG; SEYFFERT, N; CASTRO, TLP; SOARES, SC; PROSDOCIMI, F; PENA, I; OLIVEIRA, SC; ORTEGA, JM; OLIVEIRA, GC; COSER, EM; OLIVEIRA, LM; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Caracterização do conteúdo gênico e organização genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

## **A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications**

**V. D'Afonseca<sup>1</sup>, P.M. Moraes<sup>1</sup>, F.A. Dorella<sup>1</sup>, L.G.C. Pacheco<sup>1</sup>,  
R. Meyer<sup>2</sup>, R.W. Portela<sup>2</sup>, A. Miyoshi<sup>1\*</sup> and V. Azevedo<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular,  
Departamento de Biologia Geral, ICB-UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de  
Bioteração, ICS-UFBA, Belo Horizonte, MG, Brasil

\*Both authors contributed equally to this study.

Corresponding author: V. Azevedo

E-mail: vasco@icb.ufmg.br

Genet. Mol. Res. 7 (1): 252-260 (2008)

Received January 28, 2008

Accepted February 20, 2008

Published March 18, 2008

**ABSTRACT.** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a Gram-positive intracellular pathogen, is the etiological agent of caseous lymphadenitis or CLA. This bacterium infects goats and sheep and causes great economic losses worldwide annually, mainly for goat producers. Despite its importance, CLA is still poorly characterized. However, with advances in the genomic field, many *C. pseudotuberculosis* genes have already been characterized, mainly those related to virulence such as phospholipase D. Here, we examined the use of the several available genes of *C. pseudotuberculosis* and reviewed their applications in vaccine construction, more efficient diagnostics for CLA, and control of this disease, among other applications.

**Key words:** Phospholipase D; RecA; Caseous lymphadenitis

## INTRODUCTION

The genus *Corynebacterium* belongs to the group of actinomycetes that includes the CMN group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species) (Hard, 1969; Songer et al., 1988; Songer, 1997; Paule et al., 2004; Dorella et al., 2006a). These Gram-positive bacteria constitute a very heterogeneous group that shares particular characteristics, such as a specific cell wall organization (Hard, 1975; Funke et al., 1995; Collins et al., 1982, 1998; Connor et al., 2000; Bayan et al., 2003; Hall et al., 2003; Dorella et al., 2006a) and high G + C content (47-74%) (Garg et al., 1985; Goodfellow, 1989; Funke et al., 1995; Navas, 1996; Dorella et al., 2006a). Belonging to this group is *Corynebacterium pseudotuberculosis*, an important animal pathogen and the etiological agent of a disease called caseous lymphadenitis (CLA) (Williamson, 2001).

This disease is spread worldwide, and its considerable economic importance (Williamson, 2001; Paton et al., 2003) has prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic determinants of *C. pseudotuberculosis* virulence are still poorly characterized (Dorella et al., 2006a); moreover, this species has only 19 proteins identified in the GenPept database as shown in Table 1 and about 1230 genomic survey sequences (Dorella et al., 2006b) already deposited in the GenBank database.

**Table 1.** Genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* deposited in the GenPept, National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Accession number (GenPept)	Putative protein	Reference
ABI29892	10-kDa chaperonin GroES	Coelho KS and Azevedo V (unpublished results)
AAV48830	60-kDa chaperonin 1	Estevam E, Miyoshi A and Azevedo V (unpublished results)
ABI75067	65-kDa heat shock protein	Flandrois J-P and Fardel G (unpublished results)
AAB71614	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
AAB71615	AroB (3-dehydroquinase)	Simmons et al., 1997
P96749	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
P96750	AroQ (3-dehydroquinase dehydratase)	Simmons et al., 1997
AAL79811	FagA (integral membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79810	FagB (iron-enterobactin transporter)	Billington et al., 2002
AAL79809	FagC (ATP-binding cytoplasmic membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79812	FagD (iron-siderophore binding protein)	Billington et al., 2002
P20626	Phospholipase D precursor	Hodgson et al., 1990
AAA64910	Phospholipase D	Cuevas and Songer, 1993
AAA99867	Phospholipase D	McNamara et al., 1994
CAA01541	Phospholipase D	-
AAA82608	Protein recA	Pogson et al., 1996
P48288	Protein recA	Pogson et al., 1996
AAS89201	RpoB (RNA polymerase $\beta$ subunit)	Khamis et al., 2004
AAA67924	Serine proteinase precursor	Wilson et al., 1995

The majority of these genes belongs to virulence factors, or modulate positively virulence genes or encode virulence factors that confer pathogenic characteristics to *C. pseudotuberculosis*. For this reason, virulence genes are targets for the development of new vaccines and more efficient therapies and diagnostics in the control of illnesses, mainly CLA which is still managed by rudimentary prophylaxis. In this study, we conducted an overview of the cited genes, as well as their application in helping to control CLA.

## GENES AND THEIR APPLICATIONS

### Phospholipase D: virulence factor

After the report of Hodgson and colleagues (1990) about the nucleotide sequence, cloning and expression of *C. pseudotuberculosis* phospholipase D (*pld*) gene, several studies about this gene were conducted. Phospholipase D (PLD) has for some years been implicated as the major virulence factor of *C. pseudotuberculosis* (Hodgson et al., 1999). The *pld* gene encodes an exotoxin (Burrell, 1983; Hodgson et al., 1994) that probably promotes bacterial dissemination, increasing vascular permeability (Egen et al., 1989; Cardenas and Clements, 1992; Hodgson et al., 1994) through the hydrolysis of ester bonds in sphingomyelin in mammalian cell membranes following infection (Carne and Onon, 1978; Lipsky et al., 1982; Coyle and Lipsky, 1990; Tachedjian et al., 1995; Navas, 1996; Tambourgi et al., 2002; Dorella et al., 2006a), beyond enabling the bacteria to escape from neutrophils, and impairing neutrophil chemotaxis toward the site of infection (Yozwiak and Songer, 1993).

Several studies have been carried out involving the biological activities of *C. pseudotuberculosis* PLD, as well as its molecular structures, and results have shown similarities with sphingomyelinases present in the venom of the medically important spider genus *Loxosceles* (Bernheimer et al., 1985; Songer, 1997; Tambourgi et al., 2002; van Meeteren et al., 2004; Binford et al., 2005). Unlike diphtheria toxin, which occurs in about half of the isolates of *C. diphtheria* (Saragea et al., 1966; Toshach et al., 1977), PLD probably is characteristic of most or almost all strains of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* and have not been found in any other Corynebacteria (Barksdale et al., 1981).

Due to the immunogenic characteristic of the PLD, it has often been used as a tool in vaccine development against CLA. The vaccines that are currently produced for control of CLA generally use formalin-inactivated PLD-rich *C. pseudotuberculosis* culture supernatants because PLD is considered to be the major protective antigen (Pizza et al., 1989; Johnson and Nicholls, 1994; Hodgson et al., 1999), or they use DNA as vaccine (De Rose, 2002). Although a commercial vaccine is already available, it is thought that conventional attenuated vaccines are still more advantageous as they offer better long-lived humoral and cytotoxic T-lymphocyte responses (Davis et al., 1996; Chaplin et al., 1999) with only a single dose in mice (Chaplin et al., 1999). Hodgson and colleagues (1994) used a strain of *C. pseudotuberculosis* with the *pld* gene deleted from the chromosome and showed that a single subcutaneous vaccination of this attenuated strain, Toxminus, protected sheep against wild-type challenge (Hodgson et al., 1992, 1994).

Pacheco and colleagues (2007) used the *pld* gene to develop a multiplex PCR assay that also included the *rpoB* and 16S rRNA genes. This methodology allowed to differentiate *C. pseudotuberculosis* from other closely related species of Corynebacteria such as *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* (Dorella et al., 2006a), thus supplying an accurate diagnostic method for CLA directly for clinical use.

### AroB and aroQ: amino acid biosynthesis

Dehydroquinases are enzymes involved in the shikimate biosynthetic pathway. Amino acid biosynthesis was described mainly in *Escherichia coli* (Kleanthous et al., 1990) from which the dehydroquinases have already been purified (Chaudhuri et al., 1986), cloned, sequenced, and overexpressed (Maskell et al., 1988). These enzymes consist of three constitutively expressed

subtypes: a monofunctional form (Berlyn and Giles, 1969; Chaudhuri et al., 1987), a bifunctional form found in plants and a multifunctional form of dehydroquinase, which is a large polypeptide (Kleanthous et al., 1990).

Kim et al. (2006) reported the presence in *Mycobacterium tuberculosis* of such enzymes which are essential for the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan (Garbe et al., 1991), and other aromatic compounds in bacteria and other organisms such as fungi, algae and plants, but they are absent in mammals (Haslam, 1993; Kim et al., 2006). An advantage of the non-occurrence of these enzymes in mammals is the possibility of the development of new drugs (Cole et al., 1998; Camus et al., 2002; Kim et al., 2006).

Several pathogens have been attenuated by mutations in the aromatic amino acid biosynthetic pathway such as some *Salmonella* ssp (Hoiseith and Stocker, 1981; Levine et al., 1987; Schijns et al., 1994) and other pathogenic bacteria. Thus, Simmons and colleagues (1997) obtained *C. pseudotuberculosis* strains that lack virulence through attenuation of *aroB* and *aroQ* gene, using allelic exchange. Such strains were unable to cause CLA in murine models, suggesting its use as vaccine vectors and a potential attenuated vaccine in the control of CLA (Simmons et al., 1998).

### **FagA, fagB, fagC and fagD: iron uptake**

Iron acquisition is one of the most important factors for bacterial survival during infection in the host environment (Brown and Holden, 2002). This mechanism has been widely described in Gram-negative bacteria and also in Gram-positive bacteria, where several papers have been published on the molecular basis of iron uptake (Heinrichs et al., 1999; Brown et al., 2001a,b).

Studies in *Staphylococcus aureus* have reported some genes and pathways involving iron uptake and the search for the presence of siderophores (Courcol et al., 1997) and systems using ABC transporters of three compounds (Heinrichs et al., 1999; Sebulsky et al., 2000; Vera-Cabrera et al., 2001; Sebulsky and Heinrichs, 2001). A common characteristic of the occurrence of genes encoding iron transporters is their location in pathogenicity islands (PAIs), where there is evidence of horizontal transfer (Brown and Holden, 2002). PAIs have also been described in Gram-positive organisms such as *C. diphtheriae* and *S. pneumoniae*, where *C. diphtheriae* possesses a gene (*IRPI*) homologous to the ABC transporter gene (*pta*) involved in iron uptake in *S. pneumoniae*, located inside a PAI (Schmitt et al., 1997).

Wennerhold and colleagues (2005) identified a protein DtxR, which is involved in the regulation of iron uptake, mainly in high GC Gram-positive genera [e.g., *Corynebacterium*, *Mycobacterium* and *Rhodococcus* (Tao et al., 1994; Rodriguez and Smith, 2003)], and modulates the expression of siderophores and other compounds in the iron acquisition pathway.

However, in *C. pseudotuberculosis*, Billington and colleagues (2002) described an operon (*fagABC*) with 32-47% identity to proteins involved in bacterial iron uptake systems such as ABC transporters which confer to *C. pseudotuberculosis* persistence in a goat infection model. Present in this operon are four genes: *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*, located downstream from the *pld* gene. An approach used to study such genes was the fusion of the operon to *lacZ* gene to evaluate expression. It was observed that the operon was poorly expressed in iron-rich media, and in iron-limited media, the expression of  $\beta$ -galactosidase activity was increased about 3-fold, suggesting that the expression of this operon appears to contribute to the virulence of bacteria.



## Heat shock proteins: chaperonin immunogenicity and vaccine development

Heat shock proteins (HSPs) are one of the most highly conserved group of proteins among organisms (Qamra et al., 2005). They were initially described as being involved in thermal stress, but it is currently known that HSPs participate in other events such as nutrient depletion, hypotaxia, metabolic disruption, viral infection, transformation (Young and Elliot, 1989; Morimoto and Milar-ski, 1990; Young, 1990; Kultz, 2005), and other cellular processes. Chaperonin proteins are found in almost all organisms (if not all) (Braig, 1998) and are classified into six families: *Hsp10*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90*, and *Hsp100*. However, in prokaryotes, the HSPs most characterized are *hsp60* (*groEL*), *hsp70* (*dnaK*) and *hsp10* (*groES*) (Eom et al., 2005), and in the *Corynebacterium* genus two paralogous genes of *hsp60* have been described (Barreiro et al., 2004).

Studies conducted by Coelho KS, Miyoshi A and Azevedo V (unpublished data) characterized and isolated for the first time the *hsp10* and *hps60* genes of *C. pseudotuberculosis*. It is known that the majority of HSPs are able to promote a humoral and cellular response, and therefore, they have immunogenic properties. Based on this information, the same research group tested an *hsp60* DNA vaccine and a recombinant protein subunit vaccine in challenges in mice and obtained a significant production of specific IgG.

## RecA and rpoB of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: diagnostics and phylogeny

The protein RecA is present in eubacteria in general and is a highly conserved protein among bacterial organisms (Roca and Cox, 1990; Clark and Sandler, 1994; Kowalczykowski et al., 1994). It participates in homologous recombination, DNA repair, and the SOS response. Specifically, it binds stretches of single-stranded DNA and unwinds duplex DNA (Karlim et al., 1995). In this context, Pogson et al. (1996) generated isogenic mutants of *C. pseudotuberculosis* where the *recA* gene was mutated. As a result, a 10- to 12-fold reduction in recombination was obtained in the mutants compared with the parental strain, suggesting its use as a vaccine vector.

The *rpoB* gene is responsible for encoding the  $\beta$ -subunit of DNA-dependent RNA polymerase (Severinov et al., 1996; Ko et al., 2002); however, there are several lines of evidence suggesting its relation with rifampin resistance (Kim et al., 1999). Recently, *rpoB* sequences were used as an alternative tool for determining the phylogeny of some enteric bacteria (Mollet et al., 1997), *Borrelia* (Lee et al., 2000; Renesto et al., 2000), *Mycobacterium* (Kim et al., 1999), and *Bartonella* (Renesto et al., 2001). Dorella et al. (2006a) used the *rpoB* and 16S rRNA genes to build a phylogenetic tree of the *Corynebacterium* genus. This study showed that *C. pseudotuberculosis* is more closely related to *C. ulcerans* than to *C. diphtheriae*, suggesting that *C. diphtheriae* diverged from both at some time.

## Novel protein of *Corynebacterium pseudotuberculosis* - CP40: other secreted toxin?

A novel gene of *C. pseudotuberculosis* discovered by Wilson et al. (1995), CP40, encodes a protein with a molecular weight of 40 kDa and length of about 351 amino acids. Preliminary characterization of the CP40 protein revealed that it is probably a serine protease, although it did not have any homology with motifs of other serine proteases in database searched. Perhaps this absence of homology has occurred because CP40 is intrinsic to *C. pseudotuberculosis*.

This protein showed biochemical similarities with the protein PLD. Both are hydrophobic (von Heijne, 1983, 1985) and have a leader sequence containing an Ala-x-Ala cleavage motif at the C terminus. This protein was found in *C. pseudotuberculosis* culture supernatant, indicating that it is probably secreted (Walker et al., 1994).

### Approach of the gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: perspectives

Currently, there are great advances in genomics, mainly in the optimization of sequencing techniques, which means that sequencing has become less expensive and more accurate. A massive deposit of sequences such as genomic sequence survey in public databases has facilitated searches for homology and prediction of novel genes. Through these advances in the genomic field, we aim at using such tool for the discovery of new genes, new diagnostics and more efficient vaccines for CLA control. Moreover, genomes of several *Corynebacteria* spp are widely available, where this information can be used in comparative genomics to help gain better insight into gene content and genomic organization of *C. pseudotuberculosis*.

### ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by FAPEMIG REDE-2829/05 and CNPq.

### REFERENCES

- Barksdale L, Linder R, Sulea IT and Pollice M (1981). Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* 13: 335-343.
- Barreiro C, Gonzalez-Lavado E, Patek M and Martin JF (2004). Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J. Bacteriol.* 186: 4813-4817.
- Bayan N, Houssin C, Chami M and Leblon G (2003). Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* 104: 55-67.
- Berlyn MB and Giles NH (1969). Organization of enzymes in the polyaromatic synthetic pathway: separability in bacteria. *J. Bacteriol.* 99: 222-230.
- Bernheimer AW, Campbell BJ and Forrester LJ (1985). Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science* 228: 590-591.
- Billington SJ, Esmay PA, Songer JG and Jost BH (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 41-45.
- Binford GJ, Cordes MH and Wells MA (2005). Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45: 547-560.
- Braig K (1998). Chaperonins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 159-165.
- Brown JS and Holden DW (2002). Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 4: 1149-1156.
- Brown JS, Gilliland SM and Holden DW (2001a). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40: 572-585.
- Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, Holden DW, et al. (2001b). Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 69: 6702-6706.
- Burrell DH (1983). Caseous lymphadenitis vaccine. *N. S. W. Vet. Proc.* 19: 53-57.
- Camus JC, Pryor MJ, Medigue C and Cole ST (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148: 2967-2973.
- Cardenas L and Clements JD (1992). Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 328-342.

- Carne HR and Onon EO (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature* 271: 246-248.
- Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, McWaters P, et al. (1999). Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 67: 6434-6438.
- Chaudhuri S, Lambert JM, McColl LA and Coggins JR (1986). Purification and characterization of 3-dehydroquinase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 239: 699-704.
- Chaudhuri S, Duncan K and Coggins JR (1987). 3-Dehydroquinase dehydratase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 142: 320-324.
- Clark AJ and Sandler SJ (1994). Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 125-142.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Collins MD, Goodfellow M and Minnikin DE (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2503-2509.
- Collins MD, Falsen E, Akervall E, Sjoden B, et al. (1998). *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel *Corynebacterium* that does not contain mycolic acids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (Pt 4): 1449-1454.
- Connor KM, Quirie MM, Baird G and Donachie W (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2633-2637.
- Courcol RJ, Trivier D, Bissinger MC, Martin GR, et al. (1997). Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect. Immun.* 65: 1944-1948.
- Coyle MB and Lipsky BA (1990). Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 227-246.
- Cuevas WA and Songer JG (1993). *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Infect. Immun.* 61: 4310-4316.
- Davis HL, Mancini M, Michel ML and Whalen RG (1996). DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 14: 910-915.
- De Rose R, Tennent J, McWaters P, Chaplin PJ, et al. (2002). Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90: 55-63.
- Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, et al. (2006a). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201-218.
- Dorella FA, Fachin MS, Billault A, Dias NE, et al. (2006b). Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genet. Mol. Res.* 5: 653-663.
- Egen NB, Cuevas WA, McNamara PJ, Sammons DW, et al. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1319-1322.
- Eom CY, Kim E, Ro YT, Kim SW, et al. (2005). Cloning and molecular characterization of GroESL heat-shock operon in methylotrophic bacterium *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM 11726. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 695-702.
- Funke G, Lawson PA and Collins MD (1995). Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 735-739.
- Garbe T, Servos S, Hawkins A, Dimitriadis G, et al. (1991). The *Mycobacterium tuberculosis* shikimate pathway genes: evolutionary relationship between biosynthetic and catabolic 3-dehydroquinases. *Mol. Gen. Genet.* 228: 385-392.
- Garg DN, Nain SPS and Chandiramani NK (1985). Isolation and characterisation of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. *Indian Vet. J.* 62: 805-808.
- Goodfellow M (1989). Suprageneric classification of actinomycetes. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (Williams ST, Sharpe ME and Holt JG, eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, 2333-2339.
- Hall V, Collins MD, Hutson RA, Lawson PA, et al. (2003). *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1065-1068.
- Hard GC (1969). Electron microscopic examination of *Corynebacterium ovis*. *J. Bacteriol.* 97: 1480-1485.
- Hard GC (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 12: 1439-1449.
- Haslam E (1993). Shikimic acid: metabolism and metabolites. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Heinrichs JH, Gatlin LE, Kunsch C, Choi GH, et al. (1999). Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 181: 1436-1443.
- Hodgson AL, Bird P and Nisbet IT (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* 172: 1256-1261.

- Hodgson AL, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, et al. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.* 60: 2900-2905.
- Hodgson AL, Tachedjian M, Corner LA and Radford AJ (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62: 5275-5280.
- Hodgson AL, Carter K, Tachedjian M, Krywult J, et al. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 17: 802-808.
- Hoiseh SK and Stocker BA (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
- Johnson VG and Nicholls PJ (1994). Identification of a single amino acid substitution in the diphtheria toxin A chain of CRM 228 responsible for the loss of enzymatic activity. *J. Bacteriol.* 176: 4766-4769.
- Karlin S, Weinstock GM and Brendel V (1995). Bacterial classifications derived from recA protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* 177: 6881-6893.
- Khamis A, Raoult D and La Scola B (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3925-3931.
- Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, et al. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* 37: 1714-1720.
- Kim SK, Reddy SK, Nelson BC, Vasquez GB, et al. (2006). Biochemical and structural characterization of the secreted chorismate mutase (Rv1885c) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: an \*AroQ enzyme not regulated by the aromatic amino acids. *J. Bacteriol.* 188: 8638-8648.
- Kleanthous C, Campbell DG and Coggins JR (1990). Active site labeling of the shikimate pathway enzyme, dehydroquinase. Evidence for a common substrate binding site within dehydroquinase and dehydroquinase synthase. *J. Biol. Chem.* 265: 10929-10934.
- Ko KS, Lee HK, Park MY, Park MS, et al. (2002). Population genetic structure of *Legionella pneumophila* inferred from RNA polymerase gene (*rpoB*) and *DotA* gene (*dotA*) sequences. *J. Bacteriol.* 184: 2123-2130.
- Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, et al. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58: 401-465.
- Kultz D (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225-257.
- Lee SH, Kim BJ, Kim JH, Park KH, et al. (2000). Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2557-2562.
- Levine MM, Herrington D, Murphy JR, Morris JG, et al. (1987). Safety, infectivity, immunogenicity, and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. *J. Clin. Invest.* 79: 888-902.
- Lipsky BA, Goldberger AC, Tompkins LS and Plorde JJ (1982). Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1220-1235.
- Maskell DJ, Morrissey P and Dougan G (1988). Cloning and nucleotide sequence of the *aroA* gene of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 170: 2467-2471.
- McNamara PJ, Bradley GA and Songer JG (1994). Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12: 921-930.
- Mollet C, Drancourt M and Raoult D (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26: 1005-1011.
- Morimoto RI and Milarski KL (1990). Expression and function of vertebrate Hsp70 genes. In: Stress proteins in biology and medicine (Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 323-359.
- Navas J (1996). Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes. *Microbiologia* 12: 297-304.
- Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, et al. (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: 480-486.
- Paton MW, Walker SB, Rose IR and Watt GF (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 81: 91-95.
- Paule BJ, Meyer R, Moura-Costa LF, Bahia RC, et al. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 34: 311-316.
- Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, et al. (1989). Mutants of *pertussis* toxin suitable for vaccine development. *Science* 246: 497-500.
- Pogson CA, Simmons CP, Strugnell RA and Hodgson AL (1996). Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* recA gene for live vaccine vector development. *FEMS Microbiol. Lett.* 142: 139-145.

- Qamra R, Mande SC, Coates AR and Henderson B (2005). The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85: 385-394.
- Renesto P, Lorvellec-Guillon K, Drancourt M and Raoult D (2000). *rpoB* gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2200-2203.
- Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, et al. (2001). Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 39: 430-437.
- Roca AI and Cox MM (1990). The RecA protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 415-456.
- Rodriguez GM and Smith I (2003). Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol. Microbiol.* 47: 1485-1494.
- Saragea A, Maximescu P, Meitert E, Stuparu I, et al. (1966). Incidence and geographical distribution of phage types of *Corynebacterium diphtheriae* in the dynamics of the epidemic process of diphtheria in the Rumanian Socialist Republic. *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.* 11: 351-362.
- Schijns VE, Haagmans BL, Rijke EO, Huang S, et al. (1994). IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J. Immunol.* 153: 2029-2037.
- Schmitt MP, Talley BG and Holmes RK (1997). Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *Infect. Immun.* 65: 5364-5367.
- Sebulsky MT and Heinrichs DE (2001). Identification and characterization of *shuD1* and *shuD2*, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183: 4994-5000.
- Sebulsky MT, Hohnstein D, Hunter MD and Heinrichs DE (2000). Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182: 4394-4400.
- Severinov K, Mustaev A, Kukarin A, Muzzin O, et al. (1996). Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271: 27969-27974.
- Simmons CP, Hodgson AL and Strugnell RA (1997). Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 65: 3048-3056.
- Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, et al. (1998). Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66: 474-479.
- Songer JG (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5: 156-161.
- Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, et al. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 223-226.
- Tachedjian M, Krywult J, Moore RJ and Hodgson AL (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* 13: 1785-1792.
- Tambourgi DV, De Sousa Da SM, Billington SJ, Goncalves De Andrade RM, et al. (2002). Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* 107: 93-101.
- Tao X, Schiering N, Zeng HY, Ringe D, et al. (1994). Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol. Microbiol.* 14: 191-197.
- Toshach S, Valentine A and Sigurdson S (1977). Bacteriophage typing of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Infect. Dis.* 136: 655-660.
- van Meeteren LA, Frederiks F, Giepmans BN, Pedrosa MF, et al. (2004). Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279: 10833-10836.
- Vera-Cabrera L, Hernandez-Vera MA, Welsh O, Johnson WM, et al. (2001). Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3499-3504.
- von Heijine G (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21.
- von Heijine G (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184: 99-105.
- Walker J, Jackson HJ, Eggleton DG, Meeusen EN, et al. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.* 62: 2562-2567.
- Wennerhold J, Krug A and Bott M (2005). The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J. Biol. Chem.* 280: 40500-40508.
- Williamson LH (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17: 359-71, vii.
- Wilson MJ, Brandon MR and Walker J (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 63: 206-211.
- Young RA (1990). Stress proteins and immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 401-420.
- Young RA and Elliott TJ (1989). Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 59: 5-8.
- Yozwiak ML and Songer JG (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 54: 392-397.



Contents lists available at ScienceDirect

## Parasitology International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/parint](http://www.elsevier.com/locate/parint)

Short communication

Oral immunization with *Salmonella* harboring a Sm14-based DNA vaccine does not protect mice against *Schistosoma mansoni* infectionLuis G.C. Pacheco<sup>a,b,1</sup>, Vítor L.T. Mati<sup>c,1</sup>, Thiago L.P. Castro<sup>a</sup>, Fernanda A. Dorella<sup>a</sup>, Sérgio C. Oliveira<sup>b</sup>, Anderson Miyoshi<sup>a</sup>, Alan L. de Melo<sup>c</sup>, Vasco Azevedo<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, Brazil<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 January 2008

Received in revised form 15 April 2008

Accepted 16 April 2008

Available online 26 April 2008

## Keywords:

*Schistosoma mansoni*

DNA vaccine

Sm14

Oral vaccination

*Salmonella*

Granuloma

## ABSTRACT

The protection against *Schistosoma mansoni* infection was evaluated in SWISS mice orally vaccinated with an attenuated strain of *Salmonella* carrying a Sm14-based DNA vaccine. Although this formulation was not able to afford a reduction in the worm burden, a non-antigen-specific decrease in schistosome-induced granulomatous reaction was verified in livers of mice that received *Salmonella*.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

The real impact of schistosomiasis in public health worldwide is being reviewed, since the morbidity caused by this debilitating disease has effects much more drastic in populations living in endemic areas than previously estimated [1,2]. Moreover, despite appreciable achievements in developing countries like Brazil and Egypt regarding the use of anti-helminthic drugs in public control programs for schistosomiasis, the chemotherapeutic-based control strategy does have limitations [1]. Therefore, an efficient vaccine against this parasitic disease is searched by healthy agencies worldwide [1–4].

Six *Schistosoma mansoni* antigens were selected by the World Health Organization (WHO) as the most suitable for the development of a vaccine [5]. The recombinant forms of these antigens were produced in bacteria and tested in immunization/challenge studies with experimental models of schistosomiasis; fatty acid-binding protein (Sm14) is considered among the most promising antigens to continue towards clinical trials [1]. However, all the formulations tested until now have induced only partial protection to infection. Furthermore, the current consensus regarding a schistosomiasis vaccine favors an anti-pathology effect rather than only a reduction in the worm burden. Thus, in addition

to search for new candidate antigens, it is also desirable to test novel vaccine formulations and alternative vaccination strategies [2,4].

Genetic immunization is a very interesting approach to immunize against parasitic infections, mainly due to its ability of inducing both humoral and cellular immune reactions [6]. Several *S. mansoni* antigens have already been tested in DNA vaccine formulations, with the protection levels conferred to mice ranging from 20% to 50% in the majority of the studies [3]. Among the antigens are the 28-kDa antigen Sm28-GST [7], the 23-kDa integral membrane protein (Sm23) [8], the protease asparaginyl endopeptidase (Sm32) [9], the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione-S-peroxidase [10,11], and the 14-kDa antigen Sm14 [12]. An interesting approach has exploited the protective potential of multi-antigen vaccines, composed by double or triple combinations of DNA plasmids encoding three proteins of *S. mansoni*, including Sm14 [13].

All these aforementioned studies used naked DNA in their vaccine preparations. A new alternative to this approach is the use of attenuated bacteria, like some vaccine strains of *Salmonella*, as carriers of the DNA vaccines [14,15]. This method of DNA administration provides some benefits such as: (i) the possibility of target inductive sites of the host immune system due to bacterial tropism; (ii) bacterial carriers can have adjuvant effects by themselves; (iii) the process of vaccine production becomes much more easy and cost-effective; and the most attractive (iv) the vaccine can be delivered by the oral route [15].

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 31 3409 2610.

E-mail address: [vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br) (V. Azevedo).<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

In a previous study we have demonstrated that the oral immunization of mice with an attenuated *Salmonella* strain expressing a recombinant form of the 14-kDa *S. mansoni* antigen (Sm14) is able to induce 49% reduction in worm burden, as well as to significantly diminish egg deposition and liver pathology [16]. In addition, Fonseca et al. [12] have found that administration of rSm14 as a DNA vaccine formulation (pCI/Sm14) could induce 40% of protection against *S. mansoni* infection in mice.

In the present study we evaluated whether the oral administration of a *Salmonella* strain harboring the pCI/Sm14 plasmid could enhance the protection against schistosomiasis afforded by immunization with the naked plasmid.

The construction of the DNA vaccine plasmid (pCI/Sm14) was described in details elsewhere [12]. Briefly, the 402 bp cDNA sequence of the Sm14 mRNA (GenBank accession no. M60895) was cloned in the mammalian expression system pCI-neo™ (Promega) under the control of the constitutive promoter pCMV. The integrity of the Sm14 insert was confirmed through sequencing in an automatic sequencer MegaBACE™ using the DYEnamic ET DYE Terminator Kit™ (GE Healthcare) according to the instructions of the supplier (data not shown).

For preparation of the vaccine strain, the plasmid pCI/Sm14 was isolated from *Escherichia coli* DH5-α and transferred by electroporation (2.5 kV, 25 μFD, 200 Ω) to the Aro-attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium SL3261. General DNA manipulations were performed according to standardized procedures [17]. A growth curve of the vaccine strain was performed in order to determine the culture time to reach the optimum cell density in the vaccine dose, i.e. 10<sup>9</sup> bacteria (data not shown).

The experimental groups were composed by eight 6–8 weeks old female SWISS mice. Animals in vaccinated group were given orally 100 μl of a solution containing the *Salmonella* (pCI/Sm14) strain resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). In control groups, mice received the following treatments: (i) PBS solution, (ii) the *Salmonella* SL3261 strain only, and (iii) *Salmonella* SL3261 harboring the pCI-neo™ vector. Priming doses were administered in days 0, 1 and 2, and boosting doses were given in days 14, 15, 28 and 29.

Fifteen days after the last boost, mice were challenged transcutaneously with 50 cercariae of the *S. mansoni* LE strain shed by laboratory-reared and infected *Biomphalaria glabrata*. Forty five days later, animals were sacrificed by cervical fracture and adult worms were recovered by hepatic and mesenteric perfusion using the Pellegrino and Siqueira [18] technique with minor modifications. The level of protection was calculated as the mean percentage reduction in worm burden recovered in the experimental group, compared to control groups. Table 1 presents the worm burdens observed in all groups.

Although there was an apparent reduction in the worm burden recovered in the *Salmonella* (pCI/Sm14)-vaccinated mice, this value was not significantly different from those observed in the groups that received only the SL3261 strain or the bacterium harboring the control plasmid pCI-neo (Table 1), indicating that the Sm14 protein did not

**Table 1**  
Worm burdens recovered from the portal system of vaccinated mice

Groups	Worm burden (mean±S.D.) <sup>a</sup>	Variation compared with PBS (%)	Variation compared with SL3261 (pCI-neo) (%)
PBS	16.50±3.39	–	+22.22 (p=0.29) <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> SL3261	14.33±2.94	–13.15 (p=0.55) <sup>b</sup>	+6.15 (p=0.60) <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> SL3261 (pCI-neo)	13.50±2.73	–18.18 (p=0.28) <sup>b</sup>	–
<i>Salmonella</i> SL3261 (pCI/Sm14)	12.20±1.78	–26.06 (p=0.89) <sup>b</sup>	–9.63 (p=0.87) <sup>b</sup>
p-value <sup>c</sup>	0.11		

<sup>a</sup> Mean of two independent experiments.

<sup>b</sup> Turkey's test.

<sup>c</sup> ANOVA test.

**Table 2**

Mean numbers and S.D. of immature, mature and dead *Schistosoma mansoni* eggs per gram of mice intestine

Groups	Immature eggs	Mature eggs	Dead eggs	Egg shells	Total <sup>a</sup>	2 <sup>o</sup> stage eggs/g/n <sup>o</sup> of female worms
PBS	3723±1661	1098±609	182±119	412±214	5416±1921	106±33
<i>Salmonella</i> SL3261	2364±1519	1364±984	338±323	551±260	4618±2547	72±37
<i>Salmonella</i> (pCI-neo)	3353±1176	1339±606	294±329	302±250	5288±1879	90±48
<i>Salmonella</i> (pCI/Sm14)	2292±1642	1412±509	278±143	228±223	4209±2003	68±26
p-value <sup>b</sup>	0.20	0.84	0.69	0.07	0.67	0.43

<sup>a</sup> Mean of two independent experiments.

<sup>b</sup> ANOVA test.

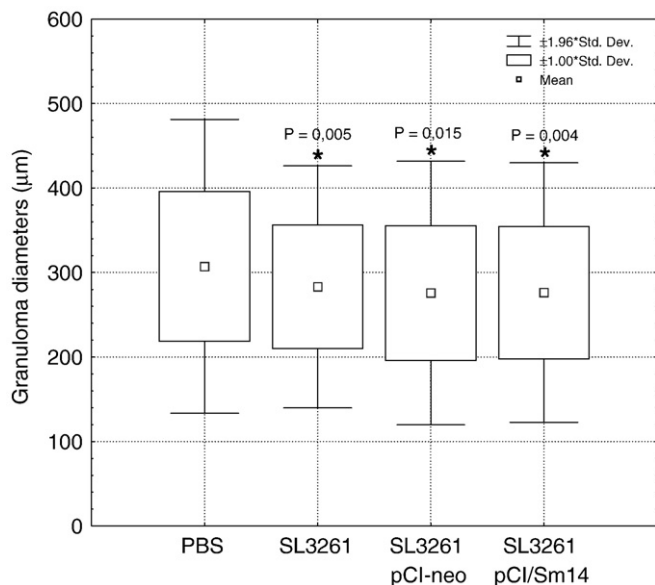
have any protective effect against schistosomiasis in the conditions tested in the present study.

In order to evaluate the humoral immune response elicited by oral vaccination with the *Salmonella* harboring the vaccine plasmid, we have performed ELISA tests for detection of specific anti-Sm14 IgG and IgA antibodies in serum and fecal samples, respectively. Samplings were carried out in fifteen-day intervals during a ninety-day period, spanning from the beginning of vaccination protocol until sacrifice, and assays were performed as previously described [16]. However, using the ELISA method we were not able to detect significant productions neither of IgG anti-Sm14 in sera nor of IgA anti-Sm14 in feces samples. Samples from mice subcutaneously injected with 25 μg of recombinant Sm14 protein were used as positive controls (data not shown).

The low antibody induction is a recurring observation in studies using DNA vaccines [19]. Moreover, a previous study that evaluated the immunity elicited by a DNA vaccine encoding the Sm14 antigen reported a very low induction of antibodies against soluble worm antigen preparation (SWAP) in BALB/c mice, even though the protection level observed had been 51% of worm burden reduction [13]. Fonseca et al. [12] observed a higher (but not very high) production of specific anti-Sm14 IgG in mice sera after immunization with the plasmid pCI/Sm14, whereas the protection level was lower (40.5%). This same study demonstrated that vaccination with the Sm14 antigen induces high production of the cytokine interferon (IFN)-gamma by CD8<sup>+</sup> T cells. This is apparently responsible for the maintenance of a Th1-cytokine environment following Sm14 vaccination and induces a cellular immune reaction rather than a humoral response.

The pathology in schistosomiasis depends on the deposition of eggs in host's tissues, and involves portal inflammation, development of hepatic granulomas and fibrotic scarring [20–22]. Thus, in order to evaluate *S. mansoni* fecundity and the distribution of eggs in the intestine we performed quantitative and qualitative oogram analyses in mice intestines according to Pellegrino and Faria method, with minor modifications [23]. Table 2 summarizes the results obtained for oogram studies.

The immature stage distribution of *S. mansoni* eggs present in mouse-intestine fragments appeared normal in all groups, indicating that there was no alteration in the egg laying oviposition kinetics of the parasites (Table 2). Furthermore, a more detailed evaluation of fecundity of the female parasites was carried out by observation of newly-laid eggs in mice intestinal wall using the ratio “number of 2<sup>o</sup> stage eggs/g of tissue/number of female worms” as previously suggested [16]. Though a slight reduction has been observed when comparing the *Salmonella* (pCI/Sm14) group to the control groups, this ratio was not statistically different, indicating that the vaccine did not affect directly the *S. mansoni* fecundity. A small reduction was also observed, not significant one again, in the total number of *S. mansoni* eggs deposited in the intestines of vaccinated mice (Table 2). Therefore, these slight decreases in the number of *S. mansoni* eggs in host tissues are better explained by an apparent reduction of parasites than by a decreased fecundity of the worms.



**Fig. 1.** Measurements of granuloma diameters observed in mice livers. Fragments of mice livers were collected, fixed in 10% formalin and processed for paraffin embedding. Five  $\mu\text{m}$ -thick sections were stained with Haematoxylin–Eosin. Measurement of granulomas was done with the aid of a micrometered ocular square adapted to the microscope. Results ( $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$ ) presented are the mean values for each group. (\*) Significantly different from PBS-group, as evaluated by ANOVA analysis followed by Turkey's test.

Interestingly, the use of live attenuated *Salmonella* as the vehicle for vaccine administration significantly reduced the egg-induced liver pathology (Fig. 1). The histopathological analysis displayed a reduction in the inflammatory infiltrate around *S. mansoni* eggs when comparing the groups that received *Salmonella* with the PBS control group. In fact, this anti-pathology effect seems to be due to the bacterial carrier rather than to the Sm14-DNA vaccine. We have already observed the effect of *Salmonella* in schistosomiasis-induced granulomatous reaction when using this bacterium to deliver a recombinant form of the Sm14 antigen [16]. In experimental schistosomiasis, Th2-polarized response correlates with the formation of large eosinophil-rich granulomas and increased hepatic fibrosis while the decrease of the mice hepatic granulomatous pathology is associated with a diminished release of Th2 cytokines and an increased production of Th1 cytokines [21,24–26]. Intracellular bacteria like *Salmonella* naturally direct the host's immune response to a Th1 profile. Thus, the administration of this live bacterium to mice probably promotes a long lasting immunomodulation that inhibits the Th1 to Th2 shift involved in the development of schistosomiasis pathology, but this hypothesis remains to be evaluated.

In summary, oral administration of live attenuated *S. enterica* var. Typhimurium as carrier of a Sm14-based DNA vaccine was not able to elicit a protective response against experimental schistosomiasis. Nevertheless, the administration of this bacterial carrier induced an immunomodulation that altered the granuloma development in mice livers, reducing their size and inflammatory reaction around the eggs, and this anti-pathology characteristic might be desirable in a probable schistosomiasis vaccine.

#### Acknowledgements

This work was supported by the grant from the Brazilian agencies CNPq and FAPEMIG. The authors acknowledge the technical help

provided by the Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE, UFMG, Brazil) and the suggestions by anonymous referees.

#### References

- [1] Chitsulo L, Loverde P, Engles D. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:12–3.
- [2] Wilson RA, Coulson PS. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(1):13–20.
- [3] Capron A, Riveau GJ, Bartley PB, McManus DP. Prospects for a schistosome vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord* 2002;2:281–90.
- [4] Pearce E. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Trop* 2003;86:309–13.
- [5] Bergquist R, Al-Sherbiny M, Barakat R, Olds R. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop* 2002;82:183–92.
- [6] Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001;100(1–2):3–12.
- [7] Dupré, Herv M, Schacht AM, Capron A, Riveau G. Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and praziquantel treatment. *J Infect Dis* 1999;180:454–63.
- [8] Da'Dara AA, Skelly PJ, Walker CM, Harn DA. A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunol* 2003;25:429–37.
- [9] Chlichlia K, Bahgat M, Ruppel A, Schirrmacher V. DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: anti-fecundity effect induced in mice. *Vaccine* 2001;20:439–47.
- [10] Shalaby KA, Yin L, Thakur A, Christen L, Niles EG, LoVerde PT. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine* 2003;22:130–6.
- [11] Cook RM, Carvalho-Queiroz C, Wilding G, LoVerde PT. Nucleic acid vaccination with *Schistosoma mansoni* antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. *Infect Immun* 2004;72:6112–24.
- [12] Fonseca CT, Pacifico LG, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD, Oliveira SC. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. *Microbes Infect* 2006;8:2509–16.
- [13] Nascimento E, Leão IC, Pereira VR, Gomes YM, Chikhlikar P, August T, et al. Protective immunity of single and multi-antigen DNA vaccines against schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:105–9.
- [14] Dietrich G, Gentschev I, Hess J, Ulmer JB, Kaufmann SH, Goebel W. Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol Today* 1999;20:251–3.
- [15] Weiss S, Krusch S. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol Chem* 2001;382:533–41.
- [16] Pacheco LGC, Zucconi E, Mati VLT, Garcia RM, Miyoshi A, Oliveira SC, et al. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop* 2005;95:132–42.
- [17] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: NY Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [18] Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Ver Bras Malariol D Trop* 1956;8:589–97.
- [19] Donnelly J, Berry K, Ulmer JB. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:457–67.
- [20] Andrade ZA, Warren KS. Mild prolonged schistosomiasis: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964;58:447–56.
- [21] Sandor M, Weinstock JV, Wynn TA. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends Immunol* 2003;24:44–52.
- [22] Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* 2007;85:148–54.
- [23] Pellegrino J, Faria J. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 1965;14:363–9.
- [24] Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1991;173:159–66.
- [25] Cheever AW, Xu Y, Macedonia JG, Cox T, Hieny S, Sher A. The role of cytokines in the pathogenesis of hepatic granulomatous disease in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87:81–5.
- [26] Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 2000;164:6406–16.



## VACINAS E A ERRADICAÇÃO DA LINFADENITE CASEOSA

Fernanda Alves Dorella, Anderson Miyoshi e Vasco Azevedo

*Segundo a Organização Mundial da Saúde “as vacinas são, depois da água potável, a principal ferramenta no combate à mortalidade no mundo.”*

A vacinação é o processo mais efetivo e menos dispendioso na profilaxia das doenças infecciosas. O objetivo de uma vacina é imunizar previamente o indivíduo de modo que ele responda de maneira rápida e eficiente quando em contato com o agente infeccioso, evitando assim, o desenvolvimento da doença. No presente artigo faremos uma abordagem a respeito das vacinas, sua história e os tipos existentes, com suas vantagens e desvantagens. Como modelo de discussão sobre a busca por uma vacina ideal, discutiremos todos os esforços que vêm sendo empregados no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a linfadenite caseosa, doença que acomete caprinos e ovinos no mundo todo, acarretando enormes perdas econômicas, visto que as vacinas disponíveis até o momento não são efetivas na erradicação desta enfermidade.

### A HISTÓRIA DAS VACINAS

Há mais de duzentos anos deu-se início à era das vacinas com a descoberta, por Edward Jenner (1749 – 1823), em 1796, da propriedade de vacinação. Ele observou que existiam, nas tetas das vacas, as mesmas lesões causadas pela varíola em humanos. Após este fato, Jenner percebeu que as mulheres responsáveis pela ordenha das vacas, quando expostas ao vírus da varíola, desenvolviam uma versão mais branda da doença.

Para testar sua teoria, Jenner recolheu o exsudato que saía de tais feridas e passou em arranhões que ele provocou em um menino saudável. O garoto teve febre e algumas lesões, mas se recuperou rapidamente. Semanas depois, o cientista expôs novamente o menino ao material da ferida de outro paciente e desta vez o menino passou incólume à doença (Figura 1). Estava descoberta a primeira vacina de que se tem notícia (Morgan e Parker, 2007).



Figura 1: A primeira vacinação feita por Jenner. (Imagem: © Bettmann/Corbis)

Cem anos depois, Louis Pasteur (1822-1895), entre pesquisas sobre fermentação alcoólica, anaerobiose e doenças infecciosas, descobriu que existiam formas “fracas” e virulentas de micróbios e que as primeiras poderiam ser usadas como agentes imunizantes contra a infecção pelas últimas (Figura 2). Iniciou-se assim a utilização da vacinação como forma de prevenção de doenças. Entre os diversos campos da ciência em que atuava, coube a Pasteur a descoberta do agente transmissor da raiva bem como da vacina anti-rábica. Esta e outras descobertas científicas levaram à fundação do renomado Instituto Pasteur (Arroio, 2006).

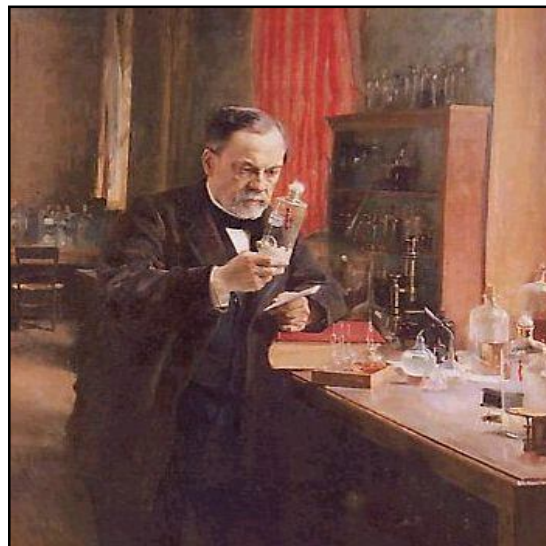


Figura 2: Pasteur em seu laboratório.

(Imagem: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-0000j-Ofn/institut-pasteur/musees>)

As descobertas de Jenner e Pasteur fizeram parte do início de uma era muito importante para a medicina: a era da vacinação. Até então, ao longo da história, grandes

epidemias de doenças infecto-contagiosas atingiram inúmeros países, cada uma com suas particularidades. E hoje em dia, doenças consideradas controladas, ou até mesmo extintas, estão reemergindo no cenário mundial. E no combate a essas doenças, a vacinação ainda é a melhor alternativa (Mahmouda e Levin, 2007).

## OS TIPOS DE VACINAS

Basicamente existem três tipos de vacinas, levando-se em consideração o modo como são formuladas.

As **vacinas de primeira geração** consistem na utilização de patógenos vivos atenuados ou mortos, capazes de induzir uma resposta imune protetora contra estes mesmos agentes em sua forma selvagem. A vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) amplamente utilizada no combate à tuberculose faz parte da categoria de vacinas de primeira geração viva e atenuada (Silva et al., 2004). Além dela, vacinas contra varíola, raiva, peste bubônica, difteria, coqueluche, tétano, febre amarela, poliomielite, sarampo e rubéola são todas vacinas de primeira geração. Embora este tipo de vacina seja predominante no mercado, atualmente sua eficácia e segurança são bastante contestadas bem como a questão ética na utilização de organismos vivos, mesmo que atenuados, em seres humanos (Schatzmayr, 2003; Movahedi e Hampson, 2008). Essas questões de biossegurança constituem uma importante plataforma de trabalho para o desenvolvimento de vacinas mais seguras (Dougan, 1994; Foss e Murtaugh, 2000). Para contornar estes problemas, hoje em dia são empregadas técnicas moleculares que permitem torná-las seguras, diminuindo a virulência do patógeno e evitando que haja reversão. Entre essas técnicas, a deleção de múltiplos genes, relacionados à virulência, ou mesmo inserções de fragmentos que interrompam tais genes no patógeno, quase que eliminam por completo o risco de que o patógeno reverta à sua forma virulenta (Jiskoot et al., 2002; Schatzmayr, 2003).

Algum tempo depois surgiram vacinas mais seguras e com espectro de atuação maior. As **vacinas de segunda geração** substituíram o microrganismo como um todo por subunidades protéicas do mesmo, ou seja, antígenos purificados ou recombinantes, isolados de cultura do próprio patógeno, responsáveis por estimular mais fortemente o sistema imune do hospedeiro. A tecnologia deste tipo de vacina baseia-se no isolamento, clonagem e expressão de genes que codificam proteínas que possuem epítomos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro. As vantagens deste tipo de vacina são a de que uma única proteína pode ter vários epítomos imunodominantes capazes de induzir uma imunidade protetora sem riscos e as adversidades de se administrar um patógeno vivo; vacinas de subunidades não se replicam no hospedeiro, portanto não há risco de patogenicidade, além da possibilidade de produção em larga escala (Silva et al., 2004; Movahedi e Hampson, 2008). A vacina contra a pneumonia pneumocócica, que contém 23 polissacarídeos diferentes da cápsula de linhagens de *Streptococcus pneumoniae*; e a vacina contra a hepatite B, que contém fragmentos antigênicos da superfície do vírus da hepatite, isolados do sangue de portadores de hepatite,

são exemplos bem sucedidos de vacinas de segunda geração (Paton e Briles, 2003). No entanto, existem dificuldades na produção deste tipo de vacina como a purificação dos antígenos e a expressão de proteínas eucarióticas em procaríotos. Além disso, a escolha de antígenos deve ser cuidadosa visto que é necessário que o epítipo eleito induza imunidade humoral e/ou celular no hospedeiro de acordo com o tipo de organismo a ser combatido (Movahedi e Hampson, 2008).

No início da década de 1990 observou-se que DNA plasmidiano poderia ser transfectado em células animais *in vivo*. Em 1993, uma molécula de DNA nu codificando genes virais conferiu imunidade protetora e trouxe surpresa aos vacinologistas (Donnelly et al., 1997; Manickan et al., 1997). A partir desta observação surgiu o questionamento: Genes poderiam virar vacinas? Desde então surgiram as **vacinas de terceira geração**, compostas de genes ou fragmentos gênicos que codificam antígenos potencialmente imunogênicos carregados por DNA plasmidiano visando induzir resposta imune protetora através da injeção direta do DNA no tecido animal (Figura 3; Donnelly, 2003).

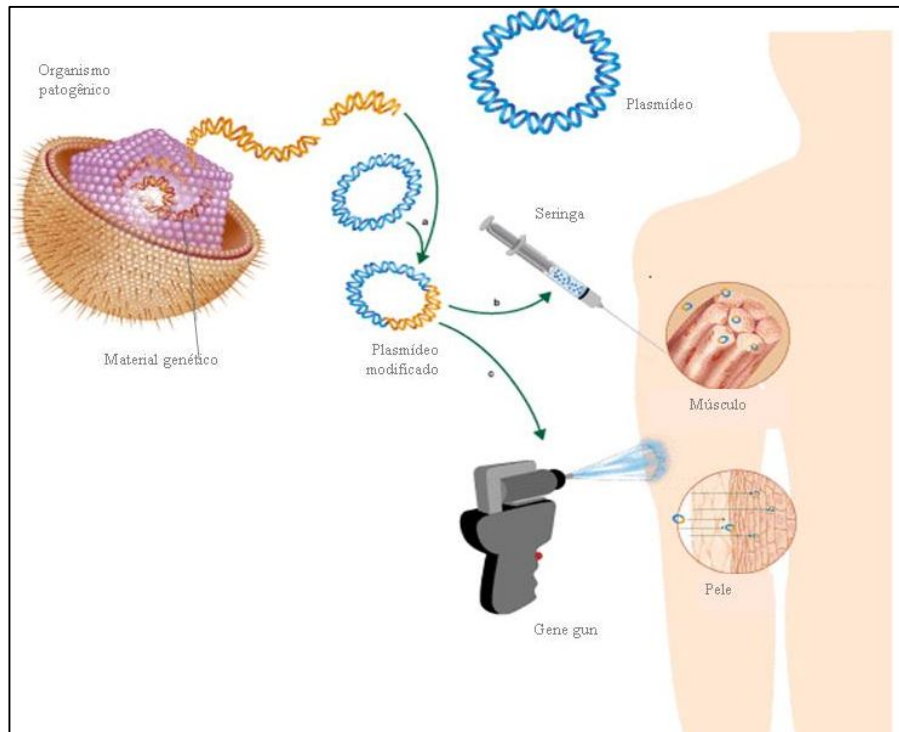


Figura 3: Vias comuns de administração das vacinas de DNA.

(Adaptado de Weiner e Kennedy, 1999).

As vantagens oferecidas pelas vacinas de terceira geração são bastante atrativas: não apresentam risco de causar infecção, uma vez que os genes utilizados são específicos para uma dada proteína antigênica; pode-se empregar um mesmo plasmídeo carregando vários genes, o que é vantajoso quando o organismo é altamente variável como um vírus; a imunidade adquirida persiste por longo tempo devido à constante produção do antígeno dentro

da célula hospedeira. Além de boa estabilidade em baixas ou altas temperaturas, o que facilita enormemente a estocagem e distribuição (Oliveira, 2004). E finalmente, as vacinas são de fácil preparação e baixo custo de produção, o que traz grandes esperanças no campo da vacinologia (Běláková et al., 2007). Uma das principais desvantagens deste tipo de vacina é o fato de não apresentar resultados tão promissores no hospedeiro final quanto em modelos laboratoriais. Por exemplo, em estudos realizados com vacinas de DNA no combate à malária, os excelentes resultados obtidos em modelo murino não se reproduziram em humanos (Dunachie e Hill, 2003).

Os benefícios resultantes do desenvolvimento de vacinas gênicas são inúmeros, como mencionado anteriormente. E o impacto gerado sobre o controle das doenças infecciosas que podem ser prevenidas por imunização gênica será, provavelmente, uma das aquisições mais importantes advindas da utilização desta tecnologia.

A imunização baseada em DNA deu início a uma nova era no ramo da vacinologia. E com isso a busca pelo desenvolvimento de novas alternativas vacinais capazes de controlar essas doenças infecciosas de modo profilático.

Em 2000 surgiu uma nova tecnologia de desenvolvimento de vacinas: a **vacinologia reversa ou vacinologia genômica** (Rappuoli, 2000). Esta nova abordagem se baseia na utilização de seqüências genômicas e de análises *in silico* para predizer antígenos potenciais que serão então isolados, clonados expressos, purificados e, finalmente, utilizados na imunização para serem avaliados quanto ao seu potencial vacinal (Figura 4).



Figura 4: Esquema da abordagem utilizada na vacinologia reversa na busca por novos candidatos vacinais.

Estes antígenos podem ser tanto proteínas completas quanto seus epítomos imunodominantes (Schatzmayr, 2003; Movahedi e Hampson, 2008). Mas nem tudo são vantagens, boas correlações de proteção são raras, sendo assim, conseguir imunidade protetora é o ponto limitante da vacinologia reversa. Outro fator limitante é a necessidade da seqüência genômica do organismo de interesse ter sido completamente elucidada.

## LINFADENITE CASEOSA COMO MODELO NA BUSCA POR UMA VACINA EFICIENTE

### Linfadenite caseosa (LC)

A LC é uma doença crônica causada pela bactéria da espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete pequenos ruminantes e é responsável por perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade e eficiência reprodutiva dos animais infectados, principalmente devido à redução da produção de lã, carne e leite, redução na eficiência de reprodução dos animais infectados e condenação de carcaças e couro em abatedouros (Dorella et al., 2006a). A manifestação da LC em pequenos ruminantes é caracterizada principalmente por necrose das glândulas linfáticas. A forma mais freqüente da doença, a LC externa, é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos (Figura 5).

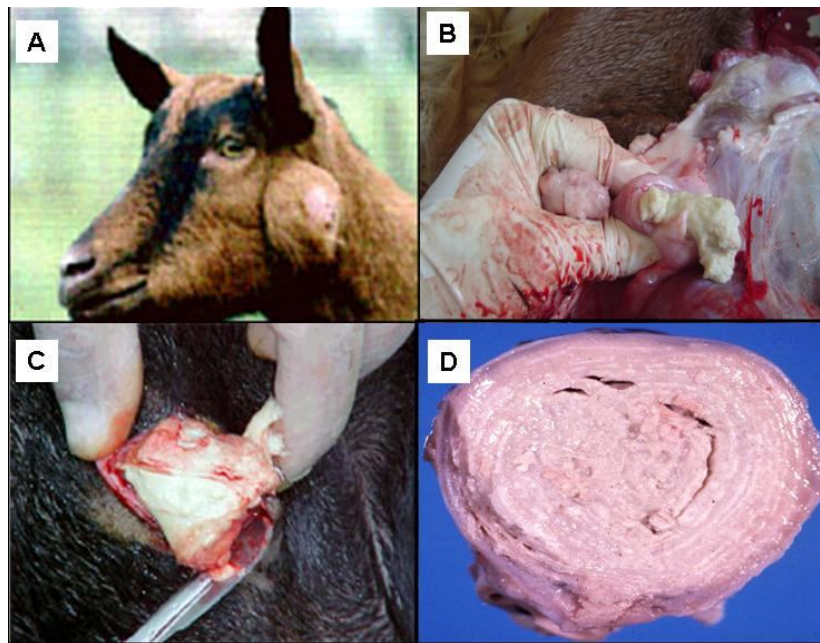


Figura 5: Lesões características de animais com LC. A) abscesso em linfonodo parotídeo, B) abscesso em linfonodo pré-escapular esquerdo, C) abscesso em linfonodo poplíteo esquerdo, e D) lesão característica de LC, abscesso com aspecto caseoso, exibindo camadas de material necrosado.

Esses abscessos podem também se desenvolver em órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (Piontkowski e Shivers, 1998). Em alguns casos, a infecção produz poucos sinais clínicos no animal, o que leva à impossibilidade de identificá-los até sua morte, tornando difícil a obtenção de dados sobre a prevalência dessa doença (Arsenault et al., 2003).

Essa enfermidade é prevalente em países como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos e Brasil, onde apresenta intensa atividade de ovino e caprinocultura (Arsenault et al., 2003). No Brasil, estimativas demonstram que a maior parte dos animais esteja infectada e a prevalência clínica seja de 30% (Ribeiro et al., 2001). Os estados da Região Nordeste são considerados os mais afetados, porém, o estado de Minas Gerais (Região Sudeste), mesmo possuindo um rebanho ainda reduzido, 84,3% dos produtores relatou ter problemas como consequência da patologia (Faria et al., 2004). Estudos recentes realizados em aproximadamente 200 propriedades do estado de Minas Gerais demonstraram uma soroprevalência da LC de 70% em ovinos e 80% em caprinos.

A transmissão da LC entre caprinos e ovinos ocorre principalmente através de ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas quanto por fatores naturais como arbustos pontiagudos (Alves e Pinheiro, 1997). O tratamento da enfermidade não é eficiente através do uso de antibióticos, pois estes não penetram na cápsula dos abscessos. Portanto, o controle da LC deve ser realizado primariamente por medidas profiláticas. Considerando que as vacinas existentes não são eficientes, a identificação dos animais infectados e a privação destes animais do convívio com os saudáveis permanecem como as principais medidas de manejo para o controle desta enfermidade (Williamson, 2001; Dorella et al., 2006a).

### **Procura-se uma vacina**

A melhor medida de custo-benefício contra a introdução ou a erradicação da LC no plantel se baseia na imunização. Além do tratamento por antibióticos não ser eficaz e ser de alto custo, a necessidade de se obter uma vacina eficiente e protetora contra a LC pode ser evidenciada pelos relatos de anos de pesquisa com esse objetivo. Entretanto, as vacinas disponíveis apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm, por exemplo, a mesma eficiência para caprinos. Por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). A ineficácia do processo de imunização pode ainda ser associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. Além disso, o estudo da disseminação da bactéria pelo plantel demonstrou que animais aparentemente sem abscedação são transmissores (Paton et al., 2003).

Vários relatos na literatura mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana,

do sobrenadante de cultura bacteriana e uma mistura de componentes celulares e sobrenadante (Holstad, 1989, LeaMaster et al., 1987, Brogden et al., 1990, Ellis et al., 1991, Eggleton et al., 1991). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis. Em nosso laboratório também estamos testando várias estratégias, com o intuito de obter uma vacina protetora e mais segura contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*, como o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas (vacinas de primeira geração), proteínas recombinantes (vacinas de segunda geração), vacinas de DNA (vacinas de terceira geração) e a busca por antígenos imunodominantes (vacinologia reversa).

### **1. Vacinas de primeira geração contra a LC**

As vacinas com microorganismo vivo são produzidas a partir da atenuação da virulência, isto é, do potencial causador de doença do microorganismo. Neste tipo de estratégia vacinal o microorganismo mantém sua capacidade de replicação, mimetizando a infecção natural e produzindo uma resposta humoral e celular. Além disso, é o tipo de vacina que confere melhor e mais prolongada resposta imunológica devido a sua similaridade à infecção natural. Uma vez que as proteínas exportadas por bactérias constituem sua principal categoria de fatores de virulência, e, conseqüentemente, alvos para a atenuação; nosso grupo de pesquisa, entre os anos de 2003 e 2005, produziu 21 diferentes mutantes de *C. pseudotuberculosis* através de mutagênese aleatória utilizando um sistema de transposição repórter baseado na fosfatase alcalina de *Enterococcus faecalis* (Dorella et al., 2006b). Este sistema de descoberta de produtos exportados em bactérias Gram-positivas foi utilizado produzindo fusões aleatórias entre genes de *C. pseudotuberculosis* e o gene repórter empregado no sistema. Como a fosfatase alcalina está ativa somente quando exportada, pudemos selecionar os mutantes que exibiam atividade de fosfatase alcalina pela visualização do produto da degradação de um substrato revelador. As seqüências de DNA que flanqueiam os sítios de inserção do transposon em cada mutante foram identificadas através de seqüenciamento. Foi possível identificar loci que codificam subunidades fimbriais, proteínas de transporte e também proteínas de função hipotética e/ou desconhecida, as quais podem, ou não, estar relacionadas à virulência e à patogenicidade deste microorganismo (Dorella et al., 2006b).

Atualmente, estas linhagens mutantes vêm sendo testadas em ensaios de imunização em camundongos com o objetivo de caracterizar *in vivo* e investigar se houve atenuação e, conseqüentemente, seu potencial vacinal durante a infecção. Os resultados obtidos até o momento nos permitiram selecionar uma linhagem mutante que confere proteção acima de 80% em modelo murino e que vem apresentando-se como o candidato mais promissor no desenvolvimento de uma vacina no combate à LC. Ensaios imunológicos utilizando os hospedeiros naturais, caprinos, estão sendo realizados com o intuito de reproduzir os bons



resultados obtidos em camundongos. Todos estes testes servirão como base para o desenvolvimento de uma possível nova vacina viva atenuada contra a linfadenite caseosa.

## **2. Vacinas de segunda e terceira gerações contra a LC**

Na produção de vacinas de segunda geração, o antígeno crítico responsável pelo desencadeamento da resposta imunológica de interesse, humoral ou celular, é obtido através da purificação de proteínas específicas do microorganismo que estimulem o sistema imune do hospedeiro ou da produção destes antígenos de forma heteróloga. *Heat-shock proteins* (HSPs) são proteínas presentes em organismos eucariotos e procariotos, codificadas por genes induzidos sob condições de estresse. Sua função é basicamente o enovelamento correto de proteínas ou seu transporte através de membranas intracelulares. Diversos estudos vêm demonstrando que, devido à sua abundância, as HSPs são os principais antígenos de muitos patógenos. As duas principais famílias de HSPs são HSP70 e HS60, que também representam os maiores alvos para anticorpos em muitos processos infecciosos (Silva, 1999; van Eden et al., 2005). Devido a estas características, HSPs de diferentes microrganismos vêm sido testadas como antígenos vacinais.

Estudos de isolamento, clonagem e caracterização molecular do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foram realizados por nosso grupo com o objetivo de avaliar o potencial desta proteína como antígeno vacinal ao ser utilizado no desenvolvimento de vacinas de subunidade protéica e de DNA. Soros de caprinos imunizados com a proteína recombinante Hsp60 e com a vacina de DNA baseada no mesmo gene foram utilizados para caracterizar a produção do isótipo IgG por meio de ensaios de ELISA indireto. Uma marcante resposta humoral foi obtida após a imunização com rHsp60, no entanto essa resposta não foi capaz de gerar uma resposta protetora contra o desafio com a linhagem selvagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Em relação à vacina de DNA, a produção de IgG e seus subtipos foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A partir deste resultado, pode-se afirmar que a imunização com a proteína recombinante induziu a produção de anticorpos específicos anti-Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*. Contudo, novamente não se verificou proteção, mesmo com a resposta humoral (Coelho et al., manuscrito em preparação).

## **3. Vacinologia reversa aplicada ao combate da LC**

A busca por antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis* vem sendo amplamente realizada. Com este propósito, o uso de soro de animais infectados e análises *in silico* de seqüências genômicas são estratégias promissoras na busca por tais antígenos.

Com o genoma de *C. pseudotuberculosis* quase que completamente elucidado torna-se viável a predição gênica e, por conseguinte, a seleção de peptídeos indutores de respostas imunes. Nosso grupo iniciou neste ano uma abordagem combinada de vacinologia reversa e mapeamento de epítomos para identificação de candidatos a vacinas, o que permitirá a

identificação de proteínas que possam estar expostas ao sistema imune sob infecção. A disponibilidade do genoma de *C. pseudotuberculosis* recém seqüenciado, a existência de outros genomas de diferentes espécies de *Corynebacterium* e de outras actinobactérias, aliadas a diversas ferramentas computacionais disponíveis para a análise de dados biológicos possibilitarão a identificação de proteínas e peptídeos potencialmente imunoprotetores para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a LC, utilizando técnicas computacionais conhecidas no processamento de dados oriundos do genoma, transcriptoma e proteoma da *C. pseudotuberculosis*, bem como organismos ortólogos (Sali et al. 2006; Bateman e Birney, 2000, Falquet et al. 2002, Servant et al. 2002; Neuweiger et al. 2007).

## CONCLUSÕES

A vacinação tornou-se a medida mais eficiente e menos dispendiosa de evitar doenças infecciosas. Contudo, recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), começou a alertar os governos para a reincidência de doenças antes consideradas controladas e para os problemas de saúde provenientes deste retorno indesejável, principalmente para os países mais pobres. Sendo assim, a busca pela vacina ideal continua. Ela deve ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vivo* e *in vitro*, deve induzir imunidade humoral e celular e ser facilmente produzida em grande escala (Babiuk, 1999; Ellis, 2001). Diversas estratégias vêm sendo empregadas, das mais simples como as vacinas de primeira geração, onde o microorganismo é utilizado vivo e atenuado ou morto e inativado, às mais complexas e elaboradas como as provenientes das técnicas de DNA recombinante e atualmente através da vacinologia reversa.

No caso do combate à LC, o modelo apresentado no presente artigo, o fato de o tratamento dos animais ser de alto custo e ineficaz, faz com que a medida de melhor custo-benefício contra a introdução da doença no plantel seja a imunização. Entretanto, não existe uma vacina eficiente e protetora contra a *C. pseudotuberculosis*. Os resultados até então obtidos com as vacinas disponíveis demonstram a necessidade de se desenvolver uma vacina que ofereça proteção eficiente, com a diminuição acentuada dos efeitos colaterais.

E a guerra contra as doenças infecciosas está apenas começando.

## REFERÊNCIAS

Alves, FSF e Pinheiro, R. Linfadenite caseosa – Recomendações e Medidas Profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura, ano 100, 1997.

Arroio, A. Louis Pasteur: um cientista humanista. *Revista Eletrônica de Ciências*, 2006.  
([http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art\\_31/EraUmaVez.html](http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_31/EraUmaVez.html))

Arsenault, J, Girard, C, Dubreuil, P, Daignault, D, Galarneau, JR, Boisclair, J, Simard, C, Bélanger, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 59:67-81.

Babiuk, LA. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*, 1999, 17:1587-1595.

Bateman, A e Birney, E. Searching databases to find protein domain organization. *Advances in Protein Chemistry*, 2000, 54:137-157.

Běláková, J, Horynová, M, Křupka, M, Weigl, E e Raška, M. DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2007, 55, 387–398.

Brogden KA, Chedid L, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Sacks J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51:200-202.

Dorella, FA, Pacheco, LG, Oliveira, SC, Miyoshi, A, Azevedo, V. a. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 2006, 37:201-18.

Dorella, FA, Estevam, EM, Pacheco, LGC, Guimarães, T, Lana, UG, Gomes, EA, Barsante, MM, Oliveira, SC, Meyer, R, Miyoshi, A, Azevedo, V. b. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 7368-7372.

Donnelly, JJ, Ulmer, JB, Shiver, JW, Liu, MA. DNA vaccines. *Annual Reviews in Immunology*, 1997, 15:617–648.

Donnelly, JJ. DNA vaccines. In: New bacterial vaccines, Ellis, RW e Brodeur, BR (Eds.), Texas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, cap. 3, pp. 30-44.

Dougan, G. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. 1993 Colworth Prize Lecture. *Microbiology*, 1994, 140:215-24.

Dunachie, SJ e Hill, AVS. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206:3771-3779.

Eggleton, D. G., C. V. Doidge, H. D. Middleton, D. W. Minty. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of the monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 1991, 68: 320-321.

Ellis, JA, Hawk, DA, Mills, KW, Pratt, DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1991, 28:303-316.

Ellis, RW. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, 2001, 19:2681-2687.

Falquet, L, Pagni, M, Bucher, P, Hulo, N, Sigrist, CJ, Hofmann, K, Bairoch, A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:235-238.

Faria, GA, Morais, OR, Guimarães, PHS. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [on-line]. 2004. Disponível em: [HTTP://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere\\_para\\_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf](http://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf).

Foss, DL e Murtaugh, MP. Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces. *Animal Health Research Reviews*, 2000, 1:3-24.

Holstad, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1989, 30:285-293.

Jiskoot, W, Kersten, GFA, Beuvery EC. Vaccine. In: Pharmaceutical Biotechnology – An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists, Crommelin, DJA e Sindelar, RD (Eds.), Londres, Taylor & Francis Group, 2002, 2a. Edição, Cap 12. pp. 259-282.

LeaMaster, BR, Shen, DT, Gorham, JR, Leathers, CW, Wells, HD. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research*, 1987, 48:869-872.

Mahmouda, A e Levin, M. Vaccines at the turn of the 21st century: a new era for immunization in public health. *International Journal of Infectious Diseases*, 2007, 11 (Supplement 2), S1- S2.

Manickan E, Karem KL, Rouse BT. DNA vaccines - a modern gimmick or a boon to vaccinology? *Critical Reviews in Immunology*, 1997, 17:139-154.

Morgan, AJ e Parker, S. Translational Mini-Review Series on Vaccines: The Edward Jenner Museum and the history of vaccination. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007, 147: 389–394.

Movahedi, AR e Hampson, DJ. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2008. doi:10.1016/j.vetmic.2008.02.011

Neuweger H, Baumbach J, Albaum S, Bekel T, Dondrup M, Hüser AT, Kalinowski J, Oehm S, Pühler A, Rahmann S, Weile J, Goesmann A. CoryneCenter - an online resource for the integrated analysis of corynebacterial genome and transcriptome data. *BMC Systems Biology*, 2007, 1:55.

Oliveira, SC. Vacinas de DNA. In: Livro Genômica, Luis Mir (Ed.), Editora Atheneu, São Paulo, 2004, cap. 24, PP. 495 – 511.

Paton, JC e Briles, DE. *Streptococcus pneumoniae*. In: New bacterial vaccines, Ellis, RW e Brodeur, BR (Eds.), Texas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, cap. 19, pp. 294-310.

Paton, MW, Walker, SB, Rose, IR, Watt, GF. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 2003; 81: 91-95

Piontkowski, MD e Shivvers, DW. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1998, 212:1765-1768.

Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3:445–450.

Ribeiro, MG, Junior, JGD, Paes, AC, Barbosa, PG, Júnior, GN, Listoni, FJP. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 2001, 68:23-28.

Sali, A, Potterton, L, Yuan, F, van Vlijmen, H, Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins*, 1995, 23:318-326.

Schatzmayr, HG. Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos*, 2003, vol. 10 (suplemento 2): 655-669.

Servant, F, Bru, C, Carrère, S, Courcelle, E, Gouzy, J, Peyruc, D, Kahn, D. ProDom: automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics*, 2002, 3:246-251.

Silva, CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes & Infections*, 1999, 1:429-35.

Silva, CL, Bonato, VLD, Castelo, AAMC, Lima, KM, Rodrigues Júnior, JM. Vacinas Gênicas. In: Livro Genômica, Luis Mir (Ed.), Editora Atheneu, São Paulo, 2004, Cap 23, páginas 463- 493.

van Eden, W, Hauet-Broere, F, Berlo, S, Paul, L, van der Zee, R, de Kleer, I, Prakken, B, Taams, L. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. *International Reviews in Immunology*, 2005, 24:181-97.

Weiner, DB, Kennedy, RC. Genetic vaccines. *Scientific American*, 1999, 281:50-57.

Williamson, LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2001; 17: 359-371.

## **2009**

### **- Publicação em periódicos:**

1. DORELLA, FA, PACHECO, LGC, SEYFFERT, N, PORTELA, RW, MEYER, R, MIYOSHI, A, AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Reviews in Vaccine*, 8(2):205-213 (2009).
2. PINHO, JMR; DORELLA, FA; COELHO, KS; FONSECA, CT; CARDOSO, FC; MEYER, R; PORTELA, RWD; OLIVEIRA, SC; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. *The Open Veterinary Science Journal*, aceito para publicação.
3. SEYFFERT, N; GUIMARÃES, AS; BASTOS, BL; PACHECO, LGC; DORELLA, FA; HEINEMANN, MB; LAGE, AP; GOUVEIA, AMG; PORTELA, RW; MEYER, R; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat flocks revealed by ELISA with *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins (manuscrito submetido).

### **- Capítulos de livros**

1. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*  
R.J. Moore, A. Miyoshi, F.A. Dorella, L.G.C. Pacheco, N. Seyffert and V. Azevedo. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* . Previsão de lançamento 2009.

### **- Patente**

1. Em fase de submissão

**- Agraciada com uma Bolsa de Pós-doutorado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (2009-2010).**





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)