

**UTILIZAÇÃO DE CEPA MUTANTE CP13 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*
ASSOCIADO ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES rCP40 E rCP1957 NO DESENVOLVIMENTO
DE VACINA PARA O CONTROLE DE LINFADENITE CASEOSA**

ALEXANDRE ANTUNES BRUM¹; ANDRÉA REZENDE¹; DANIELA DROPPA¹;
HENRIQUE ANGELO¹; SIBELE BORSUK²

¹Universidade Federal de Pelotas – alex.brum@bol.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infectocontagiosa que acomete ruminantes, entre eles caprinos e ovinos, de importância para o sul do Brasil. Essa bactéria, Gram positiva não esporulada, pode permanecer viável por um longo período em carne congelada, fezes, pele, solo, intestino e também em vísceras contaminadas, causando a condenação da carcaça dos animais, a perda da pele ocasionada pelos inúmeros abscessos podendo levar à morte (DORELLA, 2009). Sua incidência ocasiona grandes perdas econômicas especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Trata-se de uma doença de fácil contágio, bastando apenas a presença de animais infectados em um rebanho sadio, para que aja a contaminação por spray ou contato direto. Adicionalmente, o tratamento com antibióticos pode não ser viável devido ao alto custo, além de que podem não atravessar a cápsula dos abscessos, tornando-se praticamente impossível erradicar a doença e tratar animais contaminados. A vacinação é a melhor estratégia para evitar a contaminação do rebanho e a disseminação da doença. Proteínas recombinantes tem sido utilizadas juntamente a adjuvantes e bacterinas para o desenvolvimento de vacinas. A proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* é considerada um antígeno protetor contra a infecção por este agente etiológico. Estratégias vacinais utilizando vacinas compostas de bacterina como as linhagens vivas atenuadas CP13, mostraram resultados promissores (DORELLA et al., 2009). O uso de bacterinas contendo proteínas recombinantes estabelece uma nova forma de conceber estratégias vacinais, substitui o uso de adjuvantes tradicionais, como o hidróxido de alumínio em função da utilização de proteínas recombinantes associadas a antígenos celulares. Essa combinação tem sido estabelecida como essencial para a indução de uma ótima resposta imunológica contra *C. pseudotuberculosis* (CAMERON et al., 1969; CAMERON, 1972; BURRELL, 1983). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade protetiva da associação de proteínas recombinantes rCP40 e r1957 com cepa CP 13 mutante de *C. pseudotuberculosis* como estratégia vacinal para o controle de linfadenite caseosa.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepas e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas as cepas de *C. pseudotuberculosis* CP13 e Mic- 6 (cedidas pelo Dr. Vasco Azevedo, UFMG), *Escherichia coli* TOP10 e *E. coli* BL21(DE3) Star. *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio "Brain Heart Infusion" (BHI) suplementado com 0,5 % de Tween 80, a 37 °C por 72 h sob agitação. Para a fase de culturas em meio sólido, 1,5 % de ágar bacteriológico foram adicionados ao meio. As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) ou LB contendo 1,5 % de ágar bacteriológico por 16 h a 37 °C. Quando necessário o meio LB foi acrescido com 100 µg/mL de ampicilina.

2.2 Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Os vetores previamente construídos pAE/CP40 e pAE/1957 foram utilizados para a expressão das proteínas recombinantes, estes foram transformados por choque térmico na linhagem de expressão *E. coli* BL21 Star. A indução da expressão se deu pela adição de 1 mM de IPTG ao cultivo mantido sob agitação orbital a 37 °C após atingir DO_{600nm}=0,6. A expressão das proteínas recombinantes foi verificada através da técnica de Western blotting (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) utilizando-se anticorpo monoclonal anti-6xhistag conjugado com peroxidase (Sigma). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™; GE Healthcare), carregada com níquel e a pureza das mesmas determinada através de SDS-PAGE 12 % e a concentração final determinada pelo kit BCA (Pierce).

2.3 Imunização e desafio

Nos ensaios de imunização foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e mantidos segundo normas de biossegurança para o conforto animal. Esse experimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFPEL. Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias cada, os animais foram divididos em 7 grupos com 10 animais cada conforme tabela 1. Grupo controle positivo como a vacina comercial (Linfovac, VENCOFARMA) e grupo controle negativo (PBS). Todos os grupos foram imunizados via intramuscular com exceção dos grupos controle positivo. O desafio se deu por via intraperitoneal. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 15 e 30 a partir da primeira imunização e estocado a -20 °C até a dosagem de anticorpos específicos por ELISA. O desafio foi realizado 21 dias após a última dose da vacinação. Para isso, 10⁴ UFC da cepa Mic-6 de *C. pseudotuberculosis* foram inoculadas intraperitonealmente nos animais, os quais foram observados até 28 dias após o desafio.

Tabela 1. Grupos vacinais e doses administradas durante o experimento em modelo murino.

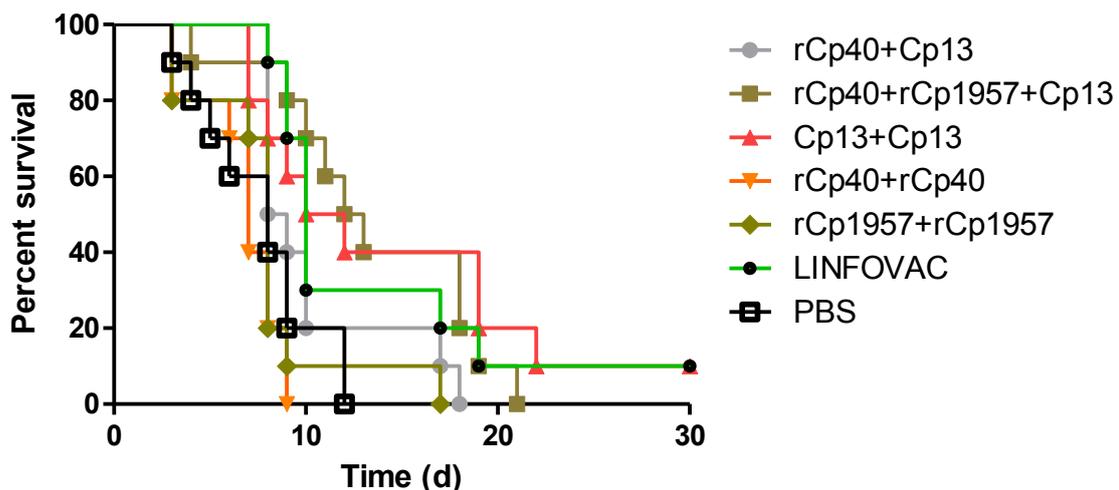
Grupos Vacinais (n=10)	Imunização		Desafio
	Dia 0	Dia 15	Dia 51
A (rCP40 + CP13)	50µg	10 ⁴ UFC CP13	10 ⁴ Mic-6
B (rCP40+r1957+CP13)	50µg	10 ⁴ UFC CP13	10 ⁴ Mic-6
C (CP13+CP13)	10 ⁴ UFC CP13	10 ⁴ UFC CP13	10 ⁴ Mic-6
D (rCP40+rCP40)	50µg	50µg	10 ⁴ Mic-6
E (r1957+r1957)	50µg	50µg	10 ⁴ Mic-6
F (Linfovac)	50µL	50µL	10 ⁴ Mic-6
G (PBS)	50µL	50µL	10 ⁴ Mic-6

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram aumento da sobrevivência de todos os grupos vacinados com a cepa CP13 (Fig. 1). Vacinas compostas de bacterina como as linhagens vivas atenuadas CP13, mostraram níveis de proteção de até 80% (DORELLA et al., 2009).

Os grupos vacinais contendo a associação de proteínas recombinantes e bacterina tiveram aumento de sobrevivência, no entanto não houve sobreviventes ao final do período de avaliação pós desafio. FONTAINE et al. (2006) reportaram o uso de bacterina contendo rPLD resultando na exclusão completa da infecção três semanas após desafio homologa.

Figura 1. Sobrevivência de camundongos imunizados



4. CONCLUSÕES

As vacinas contendo a cepa CP13 mostraram-se promissoras para novos experimentos, sendo este o primeiro experimento num total de três a serem realizados. Sendo assim, o potencial vacinal de subtipos atenuados de *C. pseudotuberculosis* tem sido evidenciado, sendo necessários novos experimentos para comprovar seu potencial de uso comercial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURREL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. **Research Veterinary Science**, 1980. v.28, p.234-237.

CAMERON, C. M.; BESTER, F. J. An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. **Onderstepoort J.Vet.Res.** 1984. v.51, n.4, p.263-267.

CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L.; ENGELBRECHT, M. M.; PURDOM, M. R. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **Onderstepoort J.Vet.Res.**, 1972. v.39, n.1, p.11-24.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert.Rev.Vaccines.**, 2009. v.8, n.2, p.205-213.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, 2006. v.24, n.33-34, p.5986-5996.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd edition. vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001

WALKER J, JACKSON HJ, EGGLETON DG, MEEUSEN EN, Wilson MJ, Brandon MR. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infect Immun.** 1994; 62:2562-7.