



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE

JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA
CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

MOSSORÓ

2024

JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA
CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ambiente, tecnologia e sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de “Mestre em ambiente, tecnologia e sociedade”.

Linha de Pesquisa: Tecnologias sustentáveis e recursos naturais do Semi-árido.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silvestre
Brilhante Bezerra

MOSSORÓ

2024

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

GG979 a	GURGEL, JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL. AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE Corynebacterium pseudotuberculosis CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS / JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL. - 2024. 50 f. : il. Orientador: Francisco Silvestre Brilhante Bezerra. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2024. 1. Vacina. 2. rPLD. 3. r01850. 4. r09720. 5. Linfadenite caseosa. I. Bezerra, Francisco Silvestre Brilhante, orient. II. Título.
------------	--

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA
CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de “Mestre em ambiente, tecnologia e sociedade”.

Linha de Pesquisa: Tecnologias sustentáveis e recursos naturais do Semi-árido.

Defendida em: 26 / 01 / 2024.

RANCA EXAMINADORA
Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA**
Data: 08/04/2024 17:50:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **TALLYSON NOGUEIRA BARBOSA**
Data: 08/04/2024 08:27:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Tallyson Nogueira Barbosa (UFPel)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **SIBELE BORSUK**
Data: 08/04/2024 16:41:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa Dra. Sibele Borsuk (UFPel)
Membro Examinador

A minha saudosa mãe (Jane Ribeiro) a quem dedico mais essa conquista na certeza que ela
está muito orgulhosa de onde estiver (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado essa oportunidade e me capacitado para chegar até o fim dessa jornada.

Agradeço a minha família, meu pai e meus irmãos que mesmo de longe sempre me apoiaram todo esse tempo, em especial minha irmã Aline Rachel que teve uma contribuição importante nesse trabalho.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Thiago Alves, Monica Ellen, Lenise, Ana Karolina, Bárbara Freitas, Gabriel, Carlos e Nicolas.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Silvestre Brilhante por confiar em mim, pela paciência que teve ao longo dessa jornada e por todo suporte que deu para meu crescimento.

Agradeço a Banca Examinadora por composta por Tallyson Nogueira e Sibele Borsuk.

Agradeço ao amigo Aluísio Neto que contribuiu grandemente com o andamento do experimento.

Agradeço a Henrique Nascimento por estar comigo nos momentos difíceis.

A todos que contribuíram para a construção deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

RESUMO

A LC é uma doença infectocontagiosa, crônica e debilitante de ovinos e caprinos que tem distribuição mundial e alta prevalência em rebanhos causando prejuízos econômicos. O tratamento com antibióticos é pouco eficaz, devido ao agente causador, a bactéria intracelular facultativa *Corynebacterium pseudotuberculosis*, formar biofilmes envolvendo a lesão, o que dificulta a ação das drogas na eliminação do patógeno. Com isso, a medida profilática mais eficiente é a vacinação dos animais saudáveis, porém até o momento nenhuma das vacinas comerciais disponíveis conferem proteção adequada. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador dos três antígenos recombinantes (rPLD, rCP09720 e rCP01850) agrupados em uma única formulação vacinal associados ao adjuvante saponina para ser testado na espécie alvo (ovinos). As proteínas recombinantes, rPLD, rCP01850 e rCP09720 foram expressas de forma heteróloga em *Escherichia coli* e purificadas. Para os experimentos de imunização e desafio, foram utilizados 12 ovinos soronegativos para a LC, que foram divididos em dois grupos de seis animais cada e distribuídos randomicamente nos seguintes grupos: G1, inoculado com solução salina 0,9% (grupo controle); G2, imunizado com a formulação multiproteica contendo 100 µg de cada proteína. Foram administradas duas doses da formulação vacinal por via subcutânea, intervaladas por 21 dias. O desafio foi realizado 30 dias após a última dose da vacina através da inoculação por via subcutânea de 10^5 UFC da cepa virulenta MIC6 de *C. pseudotuberculosis*. Após desafio os animais foram avaliados clinicamente por 12 semanas, e ao final deste período foram eutanasiados. Os linfonodos e órgãos internos foram avaliados quanto à presença de lesões. Amostras de sangue foram coletadas um dia antes da primeira imunização (dia 0), e nos dias 21, 49, 77, 105 e 133 do experimento para detecção de anticorpos anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP09720 por de ELISA indireto. Para a designação dos níveis das lesões foram atribuídos escores conforme a gravidade das lesões. O aumento significativo nos níveis de IgG anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP09720 foi observado a partir do 21º dia experimental. Os valores dos níveis de IgG permaneceram até o final do experimento (dia 133). Na análise das lesões macroscópicas e microscópicas encontradas nos linfonodos maiores scores no grupo não vacinado (G1). Quanto a lesões nos órgãos foi possível observar uma redução significativa de 100 % das lesões pulmonares no grupo vacinado (G2). Assim, conclui-se que a formulação vacinal contendo as proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720 pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas contra a LC, visto que, após o desafio nos

ovinos contra o *C. pseudotuberculosis*, ocorreu redução de lesões em linfonodos e pulmões bem como a indução de resposta imune humoral.

Palavras-chave: vacina; rCP01850; rCP09720; rPLD.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis is a chronic and debilitating infectious disease of sheep and goats that has worldwide distribution and high prevalence in herds causing economic losses to their producers. Antibiotic treatment is ineffective, because the facultative intracellular bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, forming biofilms involving the lesion, which hinders the action of the drug in eliminating the pathogen. Thus, the most efficient prophylactic measure is the vaccination of the animals, but the commercial vaccines available will not have adequate protection. This study evaluated the immunomodulatory potential of recombinant antigens (rPLD, rCP09720 and rCP01850) associated in a vaccine formulation with saponin as adjuvant tested in sheep. Studies with recombinant subunit vaccines were limited to testing only in murine, which can make the results inclusive for the disease in sheep, because the immune response of these animal species are of different profiles. The proteins, rpld, rCP01850 and rCP09720 were expressed in *Escherichia coli* and purified. For the immunization and challenge experiments, were used 12 sheep seronegative for CL, divided into two groups of six animals each. The animals were randomly distributed in groups: G1, inoculated with 0.9% saline (control group); G2, immunized with the multiprotein formulation. Two doses of the vaccine formulation were administered subcutaneously, interval for 21 days. The challenge was performed 30 days after the last dose vaccine for subcutaneous inoculation of 10^5 CFU of the virulent strain MIC6 of *C. pseudotuberculosis*. After challenge the animals were clinically evaluated for 12 weeks, and at the end of this period they were euthanized. Lymph nodes and internal organs were evaluated for the presence of lesions. The Blood samples were collected one day before the first immunization (day 0), and on days 21, 49, 77, 105 and 133 of experiment for detection of anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 antibodies by indirect ELISA. Scores were assigned according to the severity of the lesions. Significant increase in the anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels were observed starting from the 21st experimental day, denoting the effect of the first MRV dose on the humoral immune response. The values of levels remained until the end of the experiment, representing a sustained humoral immune response induced by vaccine. In the analysis of macroscopic and microscopic lesions in lymph nodes it was higher in the non-vaccinated group (G1). Thus, using this vaccine formulation with recombinant proteins of subunit may be a promising strategy for the development of vaccines against CLA, because it significantly protected the challenged sheep against *C.*

pseudotuberculosis, reducing lesions in lymph nodes and lungs and inducing a sustainable production of IgG.

Keywords: vaccine, caseous lymphadenitis, rCP01850, rCP09720, rPLD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação dos níveis de anticorpos anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti rCP09720 entre os grupos vacinado e não vacinado ao longo do período experimental.	35
Figura 2.	Comparação dos escores das lesões macroscópicas nos linfonodos.	38
Figura 3.	Abscesso encontrado no linfonodo parotídeo de um animal do G1.	38
Figura 4.	Comparação dos escores das lesões microscópicas nos linfonodos.	39
Figura 5.	Pneumonia intersticial moderada encontrada no pulmão de um ovino do G1.	39

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Escores de lesões encontradas em linfonodos de ovinos do grupo controle e 36
experimental

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Escores atribuídos às lesões macroscópicas encontradas nos linfonodos de ovinos vacinados.	36
Tabela 2.	Escores atribuídos às lesões microscópicas encontradas nos linfonodos de ovinos vacinados.	37
Tabela 3.	Escores atribuídos a lesões microscópicas encontradas em pulmões de ovinos inoculados com vacina multiproteica.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH) ₃	Hidróxido de Alumínio
ANOVA	Analysis of variance (Análise de variância)
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
LC	Linfadenite Caseosa
INF- γ	Interferon gama
MED	Densidade do Epítipo Maduro
mM	Mili Molar
PLD	Fosfolipase D
rCP01850	Fosfatase ácida recombinante de <i>C. pseudotuberculosis</i>
rCP09720	Esterase recombinante de <i>C. pseudotuberculosis</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi Árido
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	Linfadenite caseosa	20
3.1.1	Epidemiologia	20
3.1.2	Etiologia	20
3.1.3	Diagnóstico	22
3.2	Imunidade contra <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	22
3.3	Vacinas para linfadenite caseosa	23
3.4	Vacinas de subunidade recombinante	25
3.5	Alvos vacinais do estudo – rPLD, rCP09720 e rCP01850	27
3.6	Saponina como adjuvante em vacinas para LC.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Cultivo de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Escherichia coli</i>	31
4.2	Expressão e purificação das proteínas rPLD, rCP018500 e r09720	31
4.3	Aspectos éticos para uso de animais e ensaio de desafio	31
4.4	Caracterização das lesões anatomopatológicas	32
4.5	Avaliação da resposta imune humoral.....	33
4.6	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	34
5.1	Expressão das proteínas recombinantes.....	34
5.2	Avaliação da resposta imune humoral.....	34
5.3	Avaliação da taxa de redução das lesões.....	35
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS.....	44
8	ANEXOS.....	51
8.1	Anexo A – Capítulo de livro: Vacinas recombinantes de subunidade contra a linfadenite caseosa: uma mini-revisão	51
8.2	Anexo B - Manuscrito: Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> challenge in sheep.....	66

8.3	Anexo C – Protocolo de peticionamento da patente intitulada: Formulação vacinal multiproteica contendo antígenos recombinantes de corynebacterium pseudotuberculosis para imunoprofilaxia da linfadenite caseosa. Registrada no INPI sob o número BR1020230266568.....	108
-----	--	-----

1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura tem se destacado atualmente como uma atividade de elevada importância nos sistemas de produção agropecuários, tendo a região Nordeste como local onde está concentrada a maioria dos ovinos e caprinos do Brasil, sendo a criação destes pequenos ruminantes mais concentrada na região semiárida brasileira (NETO, 2015).

Dados da última pesquisa divulgados pelo IBGE, realizada em 2021, revelaram que o Brasil possui 20.537.474 cabeças de ovinos e 11.923.630 cabeças de caprinos, onde 69,9% desses ovinos e 95,2% desses caprinos estão concentrados na região Nordeste (IBGE, 2023). Esses números se refletem no impacto econômico exercido pela ovinocaprinocultura no contexto do agronegócio, especialmente na geração de emprego e renda e fixação do homem no campo nessa região (MONTEIRO et al., 2021).

Neste cenário a linfadenite caseosa ganha destaque por ser um dos principais problemas sanitários que afetam negativamente a atividade, com redução da produtividade dos rebanhos (SOUZA et al., 2011). Além disso, estima-se que as perdas econômicas somente durante a etapa de abate de caprinos sejam da ordem de 6,09% em virtude da condenação de carcaças (BARNABÉ et al., 2020).

O microrganismo causador dessa doença é a bactéria gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a qual é responsável pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais e viscerais, onde estes abscessos quando ocorrem nos linfonodos periféricos são superficiais, enquanto aqueles nos linfonodos viscerais podem ocasionar complicações sistêmicas (AFFABUTIZAMAN; CHO, 2021). Durante seu ciclo infeccioso, esta pode se disseminar por vários órgãos do animal como o fígado, baço, rins e pulmões o que culmina em agravo do estado do animal resultando em perda de peso, diminuição da produção de lã e de leite, como também em baixo desempenho reprodutivo, culminado no abate do animal e por consequências causando perdas econômicas aos produtores (FACCIOLI-MARTINS, 2014; BAIRD; FONTAINE, 2007).

Uma vez que um rebanho é infectado pelo agente causador da LC torna-se difícil a erradicação da LC, já que o tratamento com antibióticos é pouco eficaz, devido a capacidade do *Corynebacterium pseudotuberculosis* formar biofilmes envolvendo a lesão, o que dificulta a ação das drogas na eliminação do patógeno (GUIMARÃES et al., 2011). Assim, a medida profilática mais eficiente no combate e controle da infecção pela LC ainda é a vacinação dos

animais, porém nenhuma das vacinas comerciais disponíveis conferem proteção adequada em ovinos e caprinos (COSTA et al., 2011).

A descoberta de novos antígenos capazes de modular as respostas imunes humoral e celular teve seu impulso pelo avanço das técnicas de bioinformática, sendo uma delas chamada de análise da densidade de epítopo maduro (MED). Isso possibilitou uma seleção mais eficiente de antígenos a serem usados em novos alvos vacinais para LC e com isso, a condução de vários novos estudos na busca de uma vacina mais segura e eficaz (REZENDE et al., 2016; MOREIRA et al., 2022).

Estudos utilizando combinações das proteínas de subunidade recombinante rPLD, rCP09720 e rCP01850 tem sido realizados com diversas associações na busca de uma formulação vacinal eficaz obtendo como resultados níveis variados de proteção (DE PINHO et al., 2021; DROPPA-ALMEIDA, et al., 2016; SILVA et al., 2020). Essas proteínas foram previamente identificadas por análise MED como alvos promissores no desenvolvimento de vacinas contra a linfadenite caseosa (SANTANA-JORGE et al., 2016). Tal fato foi comprovado no estudo de Silva et al. (2018), o qual demonstrou que a associação dessas proteínas foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência em camundongos após desafio com *C. pseudotuberculosis*, apresentando percentuais de 30% para rPLD isolada, 40% para rPLD + rCP09720 e 50% para rPLD + rCP01850.

Levando-se em conta que muitos estudos realizados até o momento ficaram limitados aos testes apenas em murinos, e isso, torna os resultados inconclusivos para a doença na espécie alvo, visto que a resposta imunológica dos murinos e ovinos apresentam inúmeras diferenças, além disso quando um camundongo é desafiado com uma mesma carga de *C. pseudotuberculosis* que um ovino, ocorre letalidade nos camundongos, o que não acontece em animais de grande porte (PINHO et al., 2009; MOUSSA et al., 2016).

Assim, o uso do modelo murino pode ser importante para a realização de uma triagem de alvos imunogênicos e indicativos da capacidade protetora dos alvos vacinais, porém há a necessidade da confirmação da segurança e eficácia na espécie alvo para tornar efetivamente licenciada uma vacina veterinária (VICH, 2010).

Tendo em vista a grande importância da ovinocaprinocultura como atividade social e econômica, em especial na região Nordeste e suas consequências negativas para a o desenvolvimento da região, bem como a falta de uma vacina brasileira segura e eficaz contra a LC, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador dos três antígenos de subunidade recombinantes (rPLD, rCP09720 e rCP01850) combinados em uma única

formulação vacinal associados à saponina como o adjuvante para ser testado na espécie alvo (ovinos) infectados experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial imunogênico e protetor da formulação vacinal baseada na combinação de antígenos recombinantes de subunidade de *C. pseudotuberculosis*: rPLD, rCP01850 e rCP09720 associados a saponina como adjuvante contra a linfadenite caseosa em ovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP09720 a partir de *Escherichia coli*;
- Produzir uma formulação vacinal multiproteica contendo as proteínas rPLD, rCP01850, rCP09720 e o adjuvante saponina;
- Imunizar ovinos com a formulação vacinal de subunidade recombinante contra a linfadenite caseosa;
- Avaliar a resposta imune humoral conferida pela vacina após de desafio com *C. pseudotuberculosis*;
- Quantificar as lesões microscópicas e macroscópicas em linfonodos em animais vacinados e não vacinados pós-desafio;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Linfadenite caseosa

3.1.1 Epidemiologia

A linfadenite caseosa em pequenos ruminantes tem ampla distribuição mundial e sua prevalência pode ser observada nas diferentes regiões do mundo, principalmente naquelas em que praticam a ovinocaprinocultura como Austrália, África, alguns países da Europa e da América (WILLIAMSON, 2001). No Brasil, a LC é uma doença endêmica de caprinos e ovinos e apresenta alta prevalência em rebanhos do sudeste e nordeste brasileiro. É estimado que grande parte dos rebanhos estejam infectados e que a prevalência clínica seja superior a 30% (GUIMARÃES et al., 2011; ALVES et al., 2020; SEYFFERT et al., 2010).

Na região Nordeste, estima-se que a prevalência clínica de LC ultrapassa 30%, com cerca de 87,8% das propriedades possuindo animais infectados (DE FARIAS et al., 2019). De acordo com Pinheiro e colaboradores (2000) 67% dos caprinos apresentam sinais de LC no Ceará. Alguns estudos realizados nesta região apontam que a LC é a doença de maior prevalência em pequenos ruminantes (SOUZA et al., 2011).

Essa infecção causa prejuízos econômicos aos produtores de caprinos e ovinos, por provocar a condenação das carcaças dos animais, desvalorização da pele devido a cicatrizes deixadas pelos abscessos, diminuição da produção de carne e leite, além de gastos com tratamentos (DORELLA et al., 2009; SOUZA et al., 2011).

Diversos métodos, através de programas de controle, já foram implantados na tentativa de diminuir a incidência da LC, porém nenhum conseguiu êxito (DE SÁ et al., 2018). A forma subclínica da doença favorece a disseminação para outros animais, visto que os granulomas internos são difíceis de diagnosticar e os animais mesmo sem apresentar sintomas podem ser uma fonte de contaminação (MOURA-COSTA et al., 2008). Além disso, a LC apresenta um período de incubação que varia entre duas a seis semanas o que dificulta segregação dos animais infectados e sadios (CHIRINO-ZARRAGA et al., 2006).

3.1.2 Etiologia

O agente etiológico da LC é o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, anaeróbica e intracelular facultativa de macrófagos, produtora de fosfolipase D, uma exotoxina, capaz de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos facilitando sua invasão

e disseminação (SOUZA et al., 2011). Esta bactéria possui a capacidade de permanecer no meio ambiente por vários meses, o que contribui para sua propagação (DORELLA et al., 2006). Com isso, o número de animais infectados em um rebanho com lesões viscerais que não estão sendo vistas, pode ser significativamente maior do que aqueles apenas com sinais superficiais da doença (COSTA et al., 2020).

Os animais quando acometidos pela LC podem manifestar a formação de lesões granulomatosas em linfonodos superficiais e tecidos subcutâneos como também ocorre formação de lesões semelhantes em linfonodos internos, órgãos e vísceras, sendo esta na forma visceral da doença que é assintomática, sendo diagnosticada apenas quando os animais são abatidos (DE SÁ et al., 2018). Porém, independentemente do local em que a bactéria desenvolva as lesões, será formado um exsudato caseoso com aspecto branco amarelado, e este é uma fonte de contaminação pois quando as lesões supuram ocorre contaminação do meio ambiente (ALVES et al., 2007).

Apesar de raramente afetar humanos, existem relatos de transmissão zoonótica desta doença, principalmente de forma ocupacional, pela ingestão da carne contaminada ou pela ingestão de leite de cabra cru, o que demonstra importância de sua prevenção para a saúde pública (RADOSTITIS et al., 1994). Dessa forma, faz-se necessário a busca por medidas efetivas de controle, além do manejo sanitário adequado pelos criadores de animais de rebanho (MOUSSA et al., 2016).

Levando-se em conta o cenário atual onde os tratamentos disponíveis são ineficazes e inviáveis economicamente para alguns produtores a estratégia mais adequada para o controle e prevenção da LC consiste na vacinação dos animais saudáveis associada a outras medidas de manejo sanitário em todo o rebanho, como isolamento e retirada de animais infectados (DORELLA et al., 2009).

Vale ressaltar que a vacinação de um rebanho não previne a infecção dos animais pela doença, pois esta prática apenas colabora para uma redução significativa do número de animais que desenvolvem lesões pulmonares, reduzindo substancialmente a transmissão e níveis de infecção e ao passo que os animais mais velhos são abatidos ao longo do tempo, o nível infeccioso diminui, o que significa que menos animais serão infectados diminuindo a disseminação da doença nos rebanhos (WINDSOR et al., 2014).

3.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da LC baseia-se em observações clínicas nas quais se identifica os linfonodos superficiais afetados, o que é altamente sugestivo para a doença, porém na forma visceral não é possível detectar as infecções subclínicas (SILVA et al., 2019).

Existem diversos métodos de diagnóstico para LC, sendo o isolamento e identificação do *C. pseudotuberculosis* a partir do material colhido nos abscessos superficiais, considerado o teste padrão ouro (MOTTA et al., 2010). Quando não é possível realizar o diagnóstico pelo cultivo microbiológico, técnicas sorológicas como o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) podem ser empregadas, visto que este método é capaz de detectar anticorpos contra o *C. pseudotuberculosis* na forma subclínica da doença onde os animais não apresentam sinais de infecção, sendo também uma técnica de grande utilidade nos estudos de prevalência da LC nos rebanhos (Faccioli-Martins et al, 2014). Por se tratar de uma técnica econômica, fácil de executar e aplicável na rotina clínica, apresenta-se como opção a ser utilizada em programas de controle e erradicação da linfadenite caseosa (HOELZLE et al., 2013).

3.2 Imunidade contra *C. pseudotuberculosis*

Como já é conhecido, o microrganismo causador da LC é uma bactéria intracelular facultativa e seu crescimento descontrolado no interior de macrófagos faz com que células do sistema imune do hospedeiro sejam ativadas e favoreçam a formação do granuloma, resultante do encapsulamento das células infectadas (DE SÁ et al., 2018). Este processo é complexo e dependente da imunidade adaptativa, que envolve tanto a imunidade humoral quanto a celular (PAULE et al., 2003).

Em caprinos e ovinos a resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* envolve mecanismos da resposta imune inata e da resposta adaptativa (VALE, 2003). Segundo Bastos e colaboradores (2012), a progressão da doença em ovinos inicia-se com infecção primária onde o microrganismo é capturado por células fagocitárias, porém por se tratar de um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver dentro dos macrófagos a resposta imune adaptativa promove mecanismos na tentativa de eliminar ou conter a infecção através da formação de piogranulomas que são caracterizados pelo encapsulamento da bactéria (LAN et al., 2018). As etapas seguintes culminam com a disseminação linfática e hematogênica, seguida de infecção secundária dos linfonodos e órgão viscerais, a partir daí, segue-se a eliminação ou contenção da infecção, onde mecanismos imunes inatos contribuem para a

resolução da infecção ou resistência ao desenvolvimento dos piogranulomas nos animais infectados (BASTOS et al., 2012).

A capacidade do patógeno de sobreviver dentro dos macrófagos, é essencial para a migração de *C. pseudotuberculosis* do local onde a infecção se instalou até os nódulos linfáticos internos e outros tecidos (ARAÚJO, 2019). Após contornada as barreiras do sistema imunológico, a bactéria se estabelece no hospedeiro causando as infecções crônicas que podem persistir por toda a vida do animal (BAIRD E FONTAINE, 2007).

Uma formulação vacinal que consiga desenvolver uma boa ativação de linfócitos T auxiliares (CD4+) e de células T CD8+, com secreção de INF- γ e fator de necrose tumoral (TNF) são essenciais na imunidade protetora contra infecção por *C. pseudotuberculosis* visto que ambas as populações de linfócitos são importantes na resposta imune contra esse patógeno (LAN et al., 1999). Além disso, os níveis aumentados dessas citocinas são essenciais para controlar a infecção e promover mecanismos de resistência do hospedeiro contra o *C. pseudotuberculosis*, por meio da ativação de macrófagos e consequentemente a fagocitose de patógenos intracelulares (PINHO, 2021).

Em relação a imunidade humoral, um estudo conduzido por Paule e colaboradores (2003) demonstrou que existe uma cinética de produção de IgG durante o processo infeccioso, porém os títulos máximos desta variam entre os dias da infecção e como também entre as espécies de animais. Estes autores demonstram que os níveis de IgG diminuem por volta de 140 dias após a infecção, o que indica que a imunidade humoral por si só não confere imunidade duradoura (BASTOS et al., 2012).

De acordo com Yoswiak e colaboradores (1993) os anticorpos anti-PLD exercem um efeito protetor ao neutralizar a permeabilidade induzida pelo PLD, dificultando assim a disseminação do *C. pseudotuberculosis* para os linfonodos, o que está associado ao fato da capacidade destes em reduzir a disseminação secundária e diminuir o desenvolvimento de lesões.

3.3 Vacinas para linfadenite caseosa

Atualmente grande parte das pesquisas que visam desenvolver novas formulações vacinais para LC utilizam genes bacterianos como por exemplo as vacinas de DNA, ou utilizam proteínas bacterianas, como por exemplo as vacinas de subunidade recombinante, isto implica que será necessário conhecer primeiramente os genes relacionados à virulência da

bactéria para direcionar os antígenos da formulação ao desenvolvimento da resposta imune do animal (GALVÃO et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de uma vacina que venha conferir proteção adequada para uso na imunoprevenção da LC requer a compreensão do conjunto completo de determinantes moleculares de virulência usados pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* para provocar a doença nos animais, assim como entendimento do comportamento da resposta imune do hospedeiro desenvolvida contra esse patógeno (BASTOS et al., 2012).

A ocorrência dos eventos envolvidos durante a patogenia da LC, seja pela ativação da imunidade humoral, que é essencial para conter a propagação da infecção como da imunidade mediada por células que ocorre com ativação de linfócitos T CD8 e secreção de INF- γ devem ser levados em conta nos resultados dos estudos realizados em animais (BASTOS et al., 2012).

A descoberta de novos alvos vacinais fez com que estratégias modernas começassem a ser testadas em busca de uma vacina mais eficaz e segura para LC (DE PINHO et al., 2021). Com o conhecimento das diferentes técnicas já utilizadas em estudos anteriores com experimentos de vacinologias tradicionais envolvendo toxinas inativadas (EGGLETON et al., 1991), houve progressão até estratégias mais modernas como as vacinas com microrganismos geneticamente modificados (HODGSON et al., 1992), vacinas de subunidades recombinantes (SILVA et al., 2014; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016) e vacinas de DNA (Brum et al., 2017; COSTA et al., 2011). Porém nenhuma delas foi capaz de desenvolver imunidade adequada e eficácia significativa em pequenos ruminantes.

Atualmente, em alguns países existem vacinas comerciais licenciadas disponíveis para a LC, sendo a maioria compostas por toxóides formuladas com PLD inativado de *C. pseudotuberculosis* associado a antígenos de patógenos do gênero *Clostridium* (Dorella et al., 2006). No Brasil está disponível uma vacina baseada em cepa viva atenuada, vacina 1002® desenvolvida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, a qual foi licenciada no ano de 2000 baseada na cepa 1002 atenuada (DORELLA et al., 2009). Outra formulação vacinal desenvolvida utilizando a cepa viva atenuada 1002, que está disponível no Brasil é a LinfoVac®, licenciada para uso em ovinos e caprinos (BASTOS et al., 2012). Porém, nenhuma das estratégias desenvolvidas até o momento são capazes de desenvolver uma proteção total nos animais, sendo capazes apenas de reduzir a incidência e a severidade dos sinais clínicos, em contrapartida podem desencadear efeitos colaterais que vão desde a

formação de granuloma cutâneo, edema e febre, e queda na produção de leite (DROPPA-ALMEIDA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2014).

3.4 Vacinas de subunidade recombinante

As vacinas de subunidades recombinantes aparecem em um cenário em que são consideradas mais seguras, pois geralmente apresentam baixos níveis de indução de efeitos colaterais devido à alta pureza de sua formulação, com isso, eventos adversos induzidos pela vacina tornam-se menos prováveis (REZENDE et al., 2016; CHRISTENSEN, 2016). Os diversos estudos realizados com elas demonstram taxas de proteção variáveis dependendo do antígeno associado ou da combinação deste com um adjuvante (DE PINHO et al., 2021). Sua produção requer etapas de isolamento purificação e desintoxicação, o que torna esse processo mais oneroso para a indústria, porém outras estratégias podem ser utilizadas visando eliminar a etapa da purificação da proteína recombinante reduzindo assim o tempo e o custo da produção industrial (MOREIRA et al., 2016).

A associação de proteínas recombinantes tem demonstrado ser uma alternativa promissora para melhorar a proteção e imunidade contra a linfadenite caseosa principalmente por sua segurança, relacionada ao uso de antígenos puros ou semipuros (BRUM et al., 2017; DE PINHO et al., 2021; REZENDE et al., 2016). Assim, algumas estratégias foram desenvolvidas e testadas inicialmente com abordagens utilizando proteínas recombinantes de forma isolada, com diferentes abordagens, sendo uma das primeiras um estudo com uma formulação que utilizou a PLD geneticamente inativada, a qual protegeu 44% dos ovinos quando desafiados contra a *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1999). Outro estudo utilizando a proteína recombinante rHSP60 teve uma formulação testada como imunizante em camundongos na qual foi demonstrado que a administração subcutânea de rHsp60 não foi capaz de induzir proteção eficaz contra infecção intraperitoneal com *C. pseudotuberculosis* uma vez que ocorreu indução dos níveis elevados de IL-10 e esta, regula negativamente a produção de outras citocinas, como o IFN- γ (BOUSSIOTIS et al., 2000; PINHO et al., 2009).

Mais tarde uma serina protease recombinante rCP40 foi testada em camundongos e apresentou resultados bastante promissores quando foi associada a dois adjuvantes diferentes, o adjuvante de Freund e a saponina, a qual demonstrou propriedades imunogênicas gerando taxa de proteção até 100%, o que demonstra a vantagem em se utilizar associação de proteínas

de subunidade com diferentes adjuvantes em formulações vacinais (SILVA et al., 2014; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Um estudo elaborado por Rezende e colaboradores (2020) também propôs a construção de vacinas de DNA e de subunidade utilizando o alvo *cp1002_RS01850* para ser testado em camundongos os quais foram desafiados com a cepa virulenta MIC-6. A formulação vacinal foi composta pelo antígeno recombinante rCP01850 associado ao adjuvante $Al(OH)_3$ e demonstrou que apesar das estratégias utilizadas não conferir proteção adequada, essa associação aumentou a taxa de sobrevivência após desafio, o que demonstra que a utilização de apenas uma proteína de subunidade na formulação é insuficiente para fornecer níveis adequados de proteção, já que, esse mesmo grupo demonstrou que quando se usa a proteína rCP01850 em associação com a rPLD com o adjuvante saponina em uma vacina, a taxa de proteção foi melhorada em 20% em comparação com o uso de rPLD sozinha em uma formulação.

A própolis vermelha brasileira, foi usada em um estudo inovador, tendo em vista suas propriedades imunomoduladoras. Bezerra e colaboradores (2020) testaram o efeito adjuvante do óleo de própolis em uma vacina recombinante contra linfadenite caseosa em camundongos os quais foram desafiados com cepa virulenta. Após o desafio, o grupo vacinado apenas com a própolis vermelha brasileira apresentou uma taxa de sobrevivência de 20%, enquanto 70% dos camundongos do grupo imunizado com a combinação de própolis vermelha e rCP01850 sobreviveram ao desafio experimental o que fez concluir que a própolis vermelha usada sozinha tem propriedades imunoestimulantes mais relacionadas a resposta imune celular, e quando usado em combinação com a proteína recombinante rCP01850 induz respostas imunes celulares e humorais, aumentando a taxa de sobrevivência em níveis significativos.

Os benefícios da utilização de formulações vacinais contendo mais de um antígeno foi demonstrado também em um estudo conduzido por Scholl e colaboradores (2023) que avaliou o potencial imunogênico e a eficácia protetora das proteínas recombinantes rNanH e rPknG em modelo murino. O grupo de pesquisadores do referido estudo verificou que a formulação com essas proteínas associadas ao adjuvante saponina foi capaz de produzir proteção parcial nos animais desafiados, ao mesmo tempo em que geraram níveis significativos de anticorpos IgG totais. Estes caracterizaram uma resposta humoral mista com tendência ao tipo Th1. Com isso, concluem que essas formulações vacinais induzem possivelmente um fenótipo de resposta imune tipo Th1, mas propuseram como próximo passo a elucidação da resposta imune celular desencadeada.

Estes resultados são condizentes com o estudo de Silva e colaboradores (2020) que utilizaram esses mesmos alvos para imunizar camundongos e avaliar a resposta humoral e chegaram à conclusão que a formulação vacinal contendo rNanH e saponina foi capaz de gerar uma resposta imune Th1 mais pronunciada quando comparada com a formulação contendo o mesmo adjuvante e rPknG. A formulação vacinal contendo rNanH e saponina foi capaz de induzir proteção de 60%, o que trouxe como conclusão que esta formulação resultou na melhor proteção pós-desafio contra *C. pseudotuberculosis* quando comparado à vacinação com o mesmo adjuvante associado à proteína rPknG.

Estratégias utilizando proteínas de fusão também já foram testadas na busca por uma vacina mais eficaz. Como já eram conhecidos como alvos vacinais as proteínas PLD e CP40, em que se obteve resultados como produção significativa de anticorpos e ativação da resposta imune celular respectivamente, um estudo realizado por Barral e colaboradores (2022) idealizou testar uma proteína de fusão utilizando estas associadas a proteína de ligação à maltose por esta já ter sido descrita como um adjuvante intrínseco para proteínas de fusão (GONG et al., 2015). Assim, foi desenvolvida a proteína de fusão MBP:PLD:CP40 para ser avaliada sua imunogenicidade e propriedades de imunoprevenção *in silico* e *in vivo*. Os autores concluíram que essa proteína é um antígeno potencial para imunoprevenção da LC pois não possui potencial alergênico e contém múltiplos epítomos que podem ser reconhecidos pelos linfócitos B e apresentados aos linfócitos T através de moléculas MHC I e II (BARRAL et al., 2022). As análises *in vivo* demonstraram uma taxa de sobrevivência de 57,14% sendo superior ao valor obtido quando testado apenas a combinação de rCP40+rPLD, que apresentou 42,86% de proteção.

3.5 Alvos vacinais do estudo – rPLD, rCP09720 e rCP01850

Um dos fatores de virulência mais utilizados em estudos vacinais para LC é a proteína fosfolipase D (PLD), principal exotoxina produzida pelo *C. pseudotuberculosis*, indutora de produção significativa de anticorpos, que além de facilitar a sua infiltração e disseminação no hospedeiro, limita a opsonização bacteriana, permitindo o escape da fagocitose, como também inibe a entrada de Ca^{2+} em células T e reduz a produção de interleucina IL-2, que é essencial para a proliferação e crescimento de células T e produção de fator de necrose tumoral- α , tudo isso torna sistema imune do hospedeiro ineficaz para debelar a infecção (COMBS ; LU, 2015).

Devido seu papel na virulência da doença a fosfolipase D tem sido alvo de muitos estudos com abordagens de sua modificação para uso em vacinas de imunodiagnóstico (CALDERON et al., 2022). Em um desses estudos um mutante de *C. pseudotuberculosis* foi criado através da deleção do gene *pld*, sendo denominado de Toxminus, esta cepa posteriormente foi utilizada para vacinar ovinos e os animais exibiram intensa resposta Imune humoral e celular, isto associado ao fato de que as bactérias Toxminus não foram detectadas em gânglios internos estudados à necropsia após 8 semanas, demonstram que a presença da fosfolipase D é essencial para a persistência do patógeno nos tecidos do hospedeiro (CORRÊA et al., 2024).

Uma estratégia que demonstrou-se bastante promissora como opção para formulação vacinal com o uso da *pld* foi a associação desta com bacterina de *C. pseudotuberculosis*. Com a rPLD clonada da cepa britânica de *C. pseudotuberculosis* 3/99-5, experimentou-se imunizar ovinos isoladamente ou em associação com bacterina inativada com formalina em que o $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi usado como adjuvante em ambas as formulações. Após desafio com *C. pseudotuberculosis*, a vacina baseada apenas em rPLD conferiu proteção estatisticamente significativa e restringiu a disseminação da bactéria para além do local de inoculação na maioria dos animais. Entretanto, a vacina composta pela associação da rPLD com a bacterina foi capaz de conferir proteção absoluta contra a infecção, visto que a bactéria não foi recuperada dos tecidos dos animais vacinados (FONTAINE et al., 2006).

Outras pesquisas com base em combinações diferentes da rPLD geneticamente inativada (mrPLD) foram testadas utilizando bacterina e adjuvante oleoso administrada por via subcutânea, em duas doses intervaladas por 21 dias, e outra utilizando mrPLD associada ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin), onde a primeira foi capaz de conferir 100 % de proteção em ovinos desafiados com *C. pseudotuberculosis*, enquanto a segunda obteve uma taxa de 66% de proteção. Além disso foi observado que houve elevação da resposta imune humoral de em ambos os grupos e os autores do estudo atribuíram ao adjuvante oleoso a capacidade de induzir uma maior proteção vacinal (SELIM et al., 2010).

A possibilidade de se testar novos alvos foi impulsionada após o genoma da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* ter sido depositado no GeneBank em 2015, com isso, outros alvos que não haviam sido testado ainda ganharam espaço entre novas pesquisas. Em 2017, Brum e colaboradores utilizaram a proteína de subunidade recombinante rCP09720, uma esterase classificada como um dos melhores alvos para LC baseado na análise MED (SANTOS et al., 2013). Este antígeno foi associado ao adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ e foi capaz de conferir um nível de

proteção significativo contra desafio com a cepa virulenta MIC-6 em camundongos, obtendo resultados com taxa proteção parcial de 58,3%. Porém quando se utilizou uma formulação do tipo vacina de DNA (pTARGET/cp09720), esta não foi capaz de conferir proteção significativa.

No ano seguinte, em 2018, os antígenos rCP01850, uma fosfatase ácida, considerada como o terceiro alvo mais imunogênico para uso em vacinas de LC baseado na análise MED (REZENDE et al., 2016) e a rCP09720, foram associadas com a rPLD em formulações diferentes associadas ao adjuvante saponina para avaliar a resposta imune humoral e celular, e foram capazes de induzir proteção parcial de 40% e 50% em camundongos quando desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, o que demonstrou o sinergismo de rPLD com ambas duas proteínas de subunidade visto que quando essa exotoxina foi usada sozinha na formulação apresentou uma taxa de proteção de apenas 30% nos camundongos desafiados. Os autores do estudo também constataram a capacidade dessa formulação vacinal elevar os níveis de IFN- γ , citocina considerada crítica para geração de imunidade protetora, por estar associada a um perfil de resposta do tipo Th1 (BASTOS et al., 2012).

Em outro estudo Bezerra e colaboradores (2021) idealizaram um imunizante com os três alvos mais bem avaliados pela análise MED: rCP00660, rCP09720 e rCP01850, em vacinas contra a LC, onde cada alvo foi combinado individualmente com a saponina, os quais demonstraram diferentes níveis de proteção quando camundongos foram desafiados com a cepa MIC-6. A rCP01850 apresentou maior taxa de proteção significativa (60%) em relação ao grupo controle, quando comparado aos outros antígenos rCP00660 e rCP09720 que apresentaram taxas de proteção de 30% e 40% respectivamente, além de elevar os níveis IgG em relação ao grupo controle.

3.6 Saponina como adjuvante em vacinas para LC

Os adjuvantes são substâncias que tem um papel essencial em formulações vacinais de subunidade recombinante as quais são mais seguras, porém menos imunogênicas, pela sua atividade imunomoduladora, em decorrência de sua capacidade de proporcionar uma resposta imunológica melhorada e poder diminuir os custos da vacinação pela redução do número de doses necessárias para a imunização (TREGONING et al., 2018).

Apesar das formulações vacinais compostas por proteínas recombinantes oferecerem inúmeras vantagens em relação às vacinas tradicionais como o custo de produção e maior

segurança, a maioria delas são pouco imunogênicas (NASCIMENTO; LEITE, 2012). Em contrapartida, a imunogenicidade tende a ficar diminuída com o aumento da purificação, o que torna o uso de adjuvantes vacinais indispensável para induzir melhor resposta imunológica (CHRISTENSEN, 2016).

Encontrar a combinação perfeita entre o antígeno e o adjuvante que venham a conferir um alto grau de proteção nos animais se torna o maior desafio para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante para LC (REZENDE et al., 2020). Nos vários ensaios que buscam o aumento do potencial imunogênico da formulação vacinal, diferentes adjuvantes já foram testados em associação com proteínas recombinantes com o intuito de estimular a resposta imunológica do hospedeiro (DE PINHO et al. 2021). Até o momento já foram utilizados com essa finalidade alguns adjuvantes como: óleo mineral, adjuvante de Freund, proteína de ligação de maltose, hidróxido de alumínio Al(OH)_3 , saponina, montanide, própolis vermelha e extratos lipídicos de algas marinhas (BARBOSA et al., 2023; PINHO et al., 2009; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016; SELIM et al., 2010; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018; BRUM et al., 2017; REZENDE et al., 2020).

No entanto, a maioria dos estudos foi realizada em modelo murino, o que, apesar de ser uma etapa crucial no processo de avaliação de novos modelos ou procedimentos, dificulta a extrapolação de informações mais precisas para os animais-alvo para quais é estabelecido na infecção da LC (BARBOSA et al., 2023; DE PINHO et al., 2021).

As saponinas são glicosídeos triterpenóides isolados de *Quillaja saponária* e pertencem ao grupo de adjuvantes de origem vegetal, elas tem demonstrado forte potencial adjuvante em vacinas veterinárias pela sua capacidade de induzir produção de citocinas como IL-2 e $\text{INF-}\gamma$, o que implica em melhor estímulo da resposta Th1 (SINGH & O'HAGAN, 2003).

Recentemente, Barbosa e colaboradores (2023) utilizaram um extrato lipídico de macroalgas subantárticas ainda não experimentado em formulações vacinais para avaliar se este apresentava efeito adjuvante quando associado a proteína recombinante rCP01850 em vacinas recombinantes para a LC. Assim, camundongos foram imunizados e avaliados quanto a resposta imune humoral e celular. Após desafio, foi verificado que a proteína recombinante CP01850, quando associada ao extrato lipídico, promoveu uma resposta imune humoral significativa, como também provocaram a produção de citocinas envolvidas na imunidade celular como a IL-10 e o $\text{INF-}\gamma$, o que condiz com uma resposta imune mista, indicando que a formulação vacinal foi capaz gerar proteção eficaz nos camundongos contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Escherichia coli*

Para a produção das proteínas recombinantes foram utilizadas as duas cepas de *C. pseudotuberculosis* (MIC-6) cultivadas em meio *Brain Heart Infusion Broth* (caldo BHI) adicionado de 0,05% de Tween 80 em shaker orbital a 130 rpm por 48 horas a 37 °C e BHI-Ágar em estufa bacteriológica a 37°C por aproximadamente 16 horas. Também foram utilizadas as cepas de *E. coli* top 10 e *E. coli* star cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido ou LB-Ágar por aproximadamente 16 horas a 37°C sob agitação em shaker orbital, acrescido do antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL quando necessário.

4.2 Expressão e purificação das proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD

Os plasmídeos recombinantes pAE/pld, pAE/01850 e pAE/09720 foram cedidos pelo LBIP-UFPEL e introduzidos na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star através de choque térmico e a indução feita pela adição de isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1mM ao cultivo mantido sob agitação orbital a 37°C por 3 horas. Em seguida, o cultivo de *E. coli* foi centrifugado e suspenso em um tampão de lavagem (200 mM NaH₂PO₄; NaCl 500 mM, Imidazol 5 mM; Ureia 8 M pH=8,0) com adição de 100 mg/mL de lisozima e submetido à sonicação em ciclos e posteriormente mantida em refrigeração sob agitação a 4°C por 16 horas. Seguiu-se com a purificação das proteínas recombinantes através da cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap) carregada com níquel seguida da diálise em sistema baseado em tubo de celulose para desdobramento das proteínas (Sigma-Aldrich, EUA).

4.3 Aspectos éticos para uso de animais, imunização e ensaio desafio

Foram utilizados neste estudo 12 ovinos nativos, machos e fêmeas, entre 4 a 6 meses de idade, sem raça definida, proveniente de rebanhos sem sinais clínicos de doenças e sorologicamente negativos para a linfadenite caseosa. A inclusão dos animais para o experimento será realizada após a pesquisa de IgG específica para *C. pseudotuberculosis* através do teste de ELISA indireto com as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP09720. Somente animais negativos no teste serão incluídos no experimento. Os animais serão vermifugados com albendazol e mantidos em quarentena por 30 dias onde os 2 grupos

ficarão instalados separados uns dos outros em um aprisco da fazenda experimental da Universidade Federal Rural da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), antes do início do experimento. Onde serão alimentados com feno, concentrado e suplementação mineral, além de água.

Esta pesquisa foi conduzida de acordo com o Conselho Brasileiro de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) através do parecer 14/2022.

Para o ensaio de imunização os 12 ovinos foram divididos em dois grupos de seis animais cada, sendo: seis animais no grupo controle recebendo solução salina 0,9% (controle negativo – G1) e seis animais imunizados com a vacina multiproteica (grupo experimental) contendo a quantidade de 100 µg de cada proteína por dose (RODRIGUES et al., 2021), acrescida do adjuvante saponina na quantidade de 5 mg/dose de vacina (G2). Os ovinos foram imunizados com duas doses de vacina intervaladas por 21 dias. As coletas sanguíneas foram realizadas nos dias zero (antes da imunização), 21 (após a primeira dose da vacina) e 42 (após a segunda dose da vacina) do experimento. Trinta dias após a última imunização todos os animais foram desafiados com 10^5 UFC/mL da cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* por via subcutânea. Os animais foram observados semanalmente e após os critérios analisados seguiu-se com a eutanásia utilizando plano anestésico com uso de propofol.

4.4 Caracterização das lesões anatomopatológicas

Doze semanas após o desafio, os ovinos foram eutanasiados com xilazina e propofol, necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFERSA e submetidos a exame anatomopatológico completo. Órgãos internos suscetíveis de serem afetados pelo CLA (pulmões, fígado, rins e baço), linfonodos superficiais e internos foram examinados quanto a granulomas e aspectos macroscópicos (tamanho, cor, textura) e amostras de cada órgão foram coletadas para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em líquido fixador de Davidson modificado (mDF), depois levados para processamento histológico, embebidos em parafina, seccionados (espessura de 5 µm) e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Microscopicamente, as amostras foram analisadas quanto à presença de bactérias, necrose e/ou infiltrados inflamatórios. As seções foram então examinadas por um patologista treinado.

A redução das lesões foi avaliada através de exame anatomopatológico onde foram analisados aspectos macroscópicos e microscópicos dos linfonodos: pré-escapulares,

parotídeos, mesentéricos e poplíteos. Avaliando-se os achados na extensão de cada lesão foram adotados escores afim de se obter através de cálculo a taxa de redução de lesões.

Os scores foram calculados de acordo com o protocolo publicado por Selim et al. (2010) com modificações. A pontuação foi adotada com base no tipo e intensidade da lesão para cada linfonodo (mesentérico, pré-escapular direito e esquerdo, parotídeo direito e esquerdo e poplíteos direito e esquerdo) bem como nos pulmões. A caracterização das lesões macroscópicas nos linfonodos foi pontuada em uma escala de 0 a 3, sendo: Pontuação 0 aspecto normal; Pontuação 1, linfonodo aumentado; Pontuação 2, linfonodo aumentado e hemorrágico ou congestionado; Pontuação 3, aumentado com necrose focal, abscessos ou caseificação. Em relação às lesões microscópicas dos linfonodos, foi pontuado por uma escala de 0 a 3 da seguinte forma: Pontuação 0, aspecto normal; Escore 1, presença de hiperplasia linfóide folicular; Escore 2, presença de áreas hemorrágicas ou congestionadas; Escore 3, abscessos capsulados com células necróticas e infiltrado inflamatório. As lesões microscópicas nos pulmões foram pontuadas em uma escala de 0 a 2, sendo: Pontuação 0, aspecto normal; Escore 1, presença de pneumonia intersticial moderada; Escore 2, presença de pneumonia intersticial moderada e congestão.

4.5 Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada através do ELISA indireto. As amostras de sangue que foram coletadas dia 0, 21 e 42. Após a coagulação o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos, o soro foi separado e armazenado em temperatura de -20°C. As amostras de soro foram utilizadas para detecção dos níveis de IgG total e específicos para as proteínas recombinantes rCP01850, rCP09720 e rPLD. Para isso placas de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL da solução contendo tampão carbonato bicarbonato pH=9,6 contendo cada poço a quantidade de a quantidade de proteínas recombinante de acordo com a distribuição: ELISA 1: 0,5 µg/mL de rPLD (ELISA anti-rPLD), ELISA 2: 2 µg/mL de rCP01850 (ELISA anti-rCP01850), ELISA 3: 1 µg/mL de rCP09720 (ELISA anti-rCP09720), e incubadas por 16 horas a 4°C. Posteriormente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-T e 5% de leite desnatado por duas horas a 37°C. Seguindo de lavagem com PBS-T e adicionadas de 50 µL/poço das amostras dos soros de ovinos (1:400 para rPLD, 1:200 para rCP01850 e 1:100 para rCP09720 em PBS-T+1% de leite desnatado) em duplicatas. Após uma hora de incubação a 37°C e 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo

conjugado com a peroxidase anti- IgG total de ovino na diluição de 1:5000 em PBS-T com 1 % de leite desnatado. Após 45 minutos de incubação a 37°C e cinco lavagens com PBS-T, 100 µL/poço de solução reveladora [200 pmoles ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldric) diluído em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH=5 e 0,05% H₂O₂] foram adicionados. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL/poço da solução de parada contendo ácido sulfúrico 4 N. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8 para windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças entre a produção de IgG nos referidos grupos experimentais foram verificadas através do one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de p menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão das proteínas recombinantes

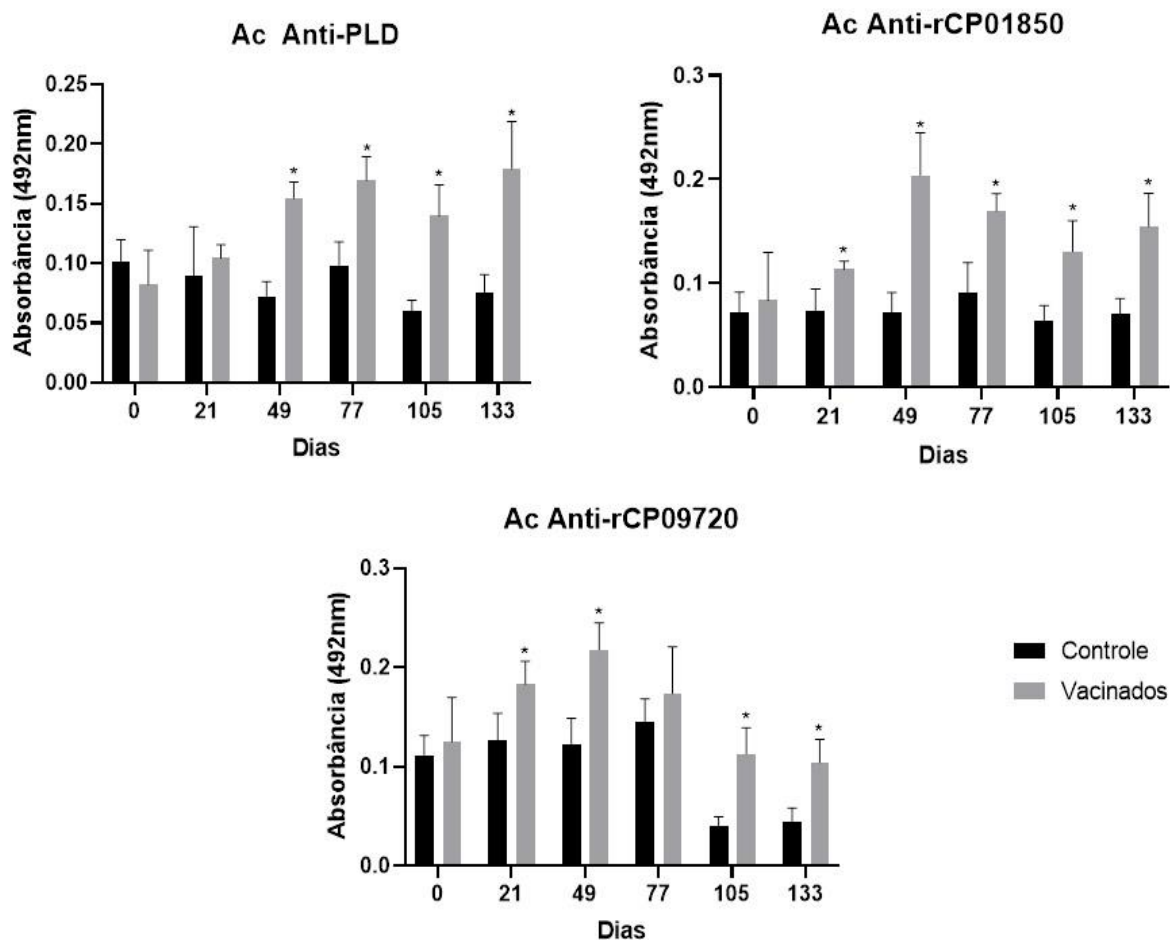
A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada por Western blot com um anticorpo monoclonal anti-6X-His, e as bandas reativas com pesos moleculares de 31 (rPLD), 33,5 (rCP01850) e 35 kDa (rCP09720) indicaram a expressão bem-sucedida das proteínas. As proteínas foram expressas em corpos de inclusão em *E. coli*, e foram solubilizadas em uréia 8M para purificação. Os rendimentos obtidos após purificação e re-dobramento foram de 3,669 mg/L, 5,376 mg/L e 2,217 mg/L para rPLD, rCP01850 e rCP09720, respectivamente.

5.2 Avaliação da resposta imune humoral

A avaliação da resposta imune humoral foi realizada através da detecção dos níveis de IgG total e anticorpos específicos produzidos contra os antígenos recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720 por ELISA indireto nos dias 0, 21, 49, 77, 105 e 133. Os grupos que receberam a formulação vacinal contendo proteínas recombinantes apresentaram anticorpos detectáveis, indicando que as proteínas administradas eram imunogênicas nos animais imunizados.

FIGURA 1 - Comparação dos níveis de anticorpos anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP09720 nos grupos vacinado e não-vacinado ao longo do período experimental. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo. O (*) representa diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Autoria própria



5.3 Avaliação da taxa de redução das lesões

Doze semanas após o desafio, os animais foram eutanasiados, através do aprofundamento do plano anestésico com propofol, e necropsiados no laboratório de patologia veterinária da UFERSA. Os ovinos foram submetidos ao exame anatomopatológico. Os principais órgãos que podem ser acometidos na LC (como pulmões, fígado, rins e baço) foram analisados quanto aos aspectos macroscópicos. Os linfonodos superficiais e os internos também foram examinados em busca de lesões em cada um desses órgãos. Assim, foram analisados os linfonodos: pré-escapulares, parotídeos, mesentéricos e poplíteos.

As lesões foram organizadas por categorias através dos escores feitos a partir da gravidade das lesões e com isso foi possível calcular a taxa de indução das lesões.

Quadro 1 - Características morfológicas e sua correlação com os escores das lesões encontradas nos linfonodos de ovinos.

Escore	Achados macroscópicos de acordo com o escore
0/3	Linfonodos normais ou um pouco aumentados
1/3	Linfonodos aumentados
2/3	Linfonodos aumentados com hemorragia ou congestão
3/3	Linfonodos aumentados com necrose ou abscessos

Fonte: Autoria própria

O cálculo dos escores da pontuação por grupo de linfonodos teve por base as seguintes pontuações máximas:

- Pontuação máxima para cada linfonodo = 03;
- Pontuação máxima para cada animal (7 x 3 = 21);
- Pontuação máxima para cada grupo (6 x 21 = 126).

Tabela 1 - Escores atribuídos às lesões macroscópicas encontradas nos linfonodos de ovinos inoculados com vacina recombinante multiproteína (G2), em comparação ao grupo controle (G1).

Escore das lesões macroscópicas dos linfonodos									Score total por grupo*	Índice de indução de lesão*	Taxa de redução relativa de lesões
Grupo de ovinos	Animal	Pré-escapular		Parotídeo		Poplíteo		Mesentérico			
		Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo				
G1 (solução salina)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	+ (1/3)	36/126	0,286	86,36%
	A2	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (rCP09720 + rCP01850 + rPLD)	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	5/126	0,039	
	A8	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A9	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A10	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			

A11	+	(1/3)	+	(1/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)
A12	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)	-	(0/3)

As lesões macroscópicas nos linfonodos foram pontuadas em escala de 0-3, sendo: escore 0, aspecto normal; escore 1, linfonodo aumentado, escore 2, linfonodo aumentado e hemorrágico ou congestionado; escore 3, linfonodo aumentado com necrose focal, abscessos ou caseação. * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. RPS = prescapular direito; LPS = prescapular esquerdo; RPA = parótida direita; LPA = parótida esquerda; RPO = poplíteo direito; LPO = poplíteo esquerdo.

Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Escores atribuídos a lesões microscópicas encontradas em linfonodos de ovinos inoculados com vacina recombinante multiproteína (G2), em comparação ao grupo controle (G1).

Escore das lesões microscópicas dos linfonodos									Score total por grupo*	Índice de indução de lesão*	Taxa de redução relativa de lesões
Grupo de ovinos	Pré-escapular			Parotídeo		Poplíteo		Mesentérico			
	Animal	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo				
G1 (solução salina)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	36/126	0,286	80,77%
	A2	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A4	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (rCP09720 + rCP01850 + rPLD)	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	-(0/3)	7/126	0,055	
	A8	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	-(0/3)			
	A9	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A10	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A11	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

As lesões microscópicas nos linfonodos foram pontuadas em escala de 0-3, sendo: escore 0, aspecto normal; escore 1, presença de hiperplasia linfóide folicular; escore 2, presença de áreas hemorrágicas ou congestionadas; escore 3, abscesso capsulado, células necróticas e infiltrado inflamatório. * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. RPS = prescapular direito; LPS = prescapular esquerdo; RPA = parótida direita; LPA = parótida esquerda; RPO = poplíteo direito; LPO = poplíteo esquerdo.

Fonte: Autoria Própria.

FIGURA 2 - Comparação dos escores das lesões macroscópicas nos linfonodos.
Fonte: Autoria própria

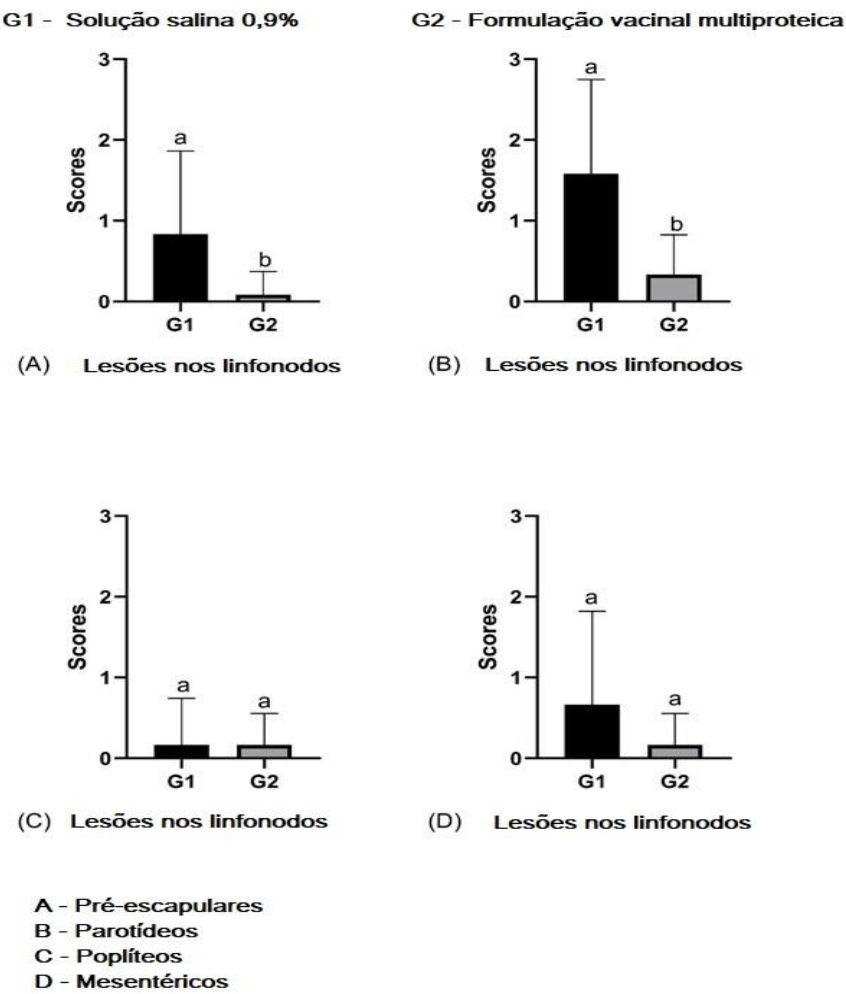
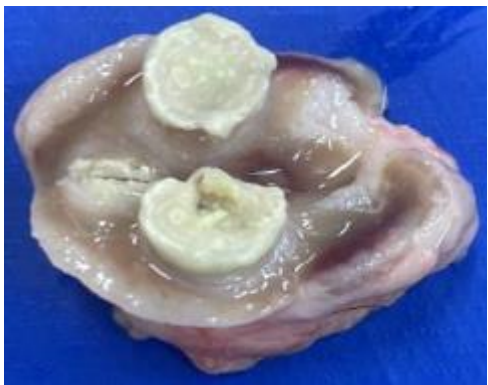


Figura 3 - Abscesso encontrado no linfonodo parotídeo de um animal do G1 (solução salina)



Fonte: Autoria própria

FIGURA 4 - Comparação dos escores das lesões microscópicas nos linfonodos.
 Fonte: Autoria própria

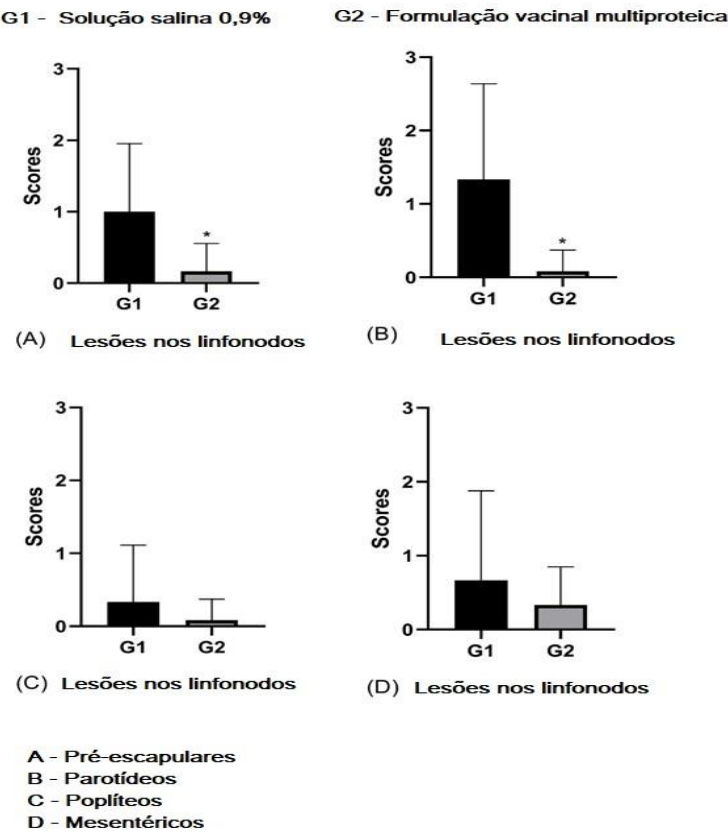
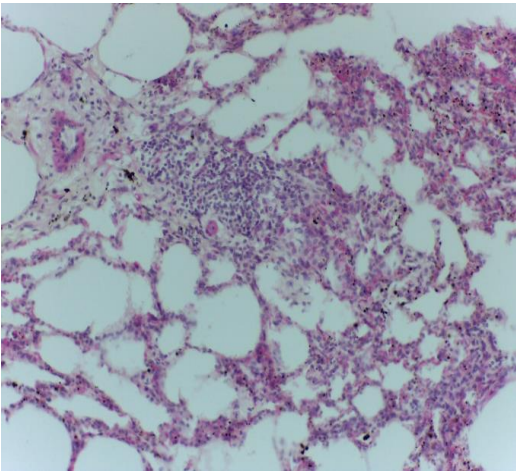


FIGURA 5 - Pneumonia intersticial moderada encontrada no pulmão de um ovino do G1 (solução salina). HE x 100.



Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Escores atribuídos a lesões microscópicas encontradas em pulmões de ovinos inoculados com vacina multiproteica (G2), em comparação ao grupo controle (G1).

Escores de lesões microscópica de pulmões				Score total por grupo	Índice de lesões induzidas*	Índice de lesões reduzidas relativas	
Grupos	Animal	Pulmão					
		Direito	Esquerdo				
G1 (solução salina)	A1	+ (1/2)	+ (1/2)	12/24	0,5	100 %	
	A2	+ (1/2)	+ (1/2)				
	A3	++ (2/2)	++ (2/2)				
	A4	++ (2/2)	++ (2/2)				
	A5	- (0/2)	- (0/2)				
	A6	- (0/2)	- (0/2)				
G2 (rCP09720 + rCP01850 + rPLD)	A7	- (0/2)	- (0/2)	0/24	0		
	A8	- (0/2)	- (0/2)				
	A9	- (0/2)	- (0/2)				
	A10	- (0/2)	- (0/2)				
	A11	- (0/2)	- (0/2)				
	A12	- (0/2)	- (0/2)				

As lesões microscópicas nos pulmões foram pontuadas em escala de 0-2, sendo: Escore 0, aspecto normal; Escore 1, presença de pneumonia intersticial moderada; Escore 2, presença de pneumonia intersticial moderada e congestão. * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade imunogênica das proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720, de *C. pseudotuberculosis* e sua eficácia protetora na infecção em ovinos. Até momento este é o primeiro estudo a avaliar essa associação multiproteica em uma formulação imunizando a espécie-alvo da LC. Recentemente, Moreira e colaboradores (2020) mostraram o benefício de adicionar a combinação de proteínas rSpaC, rSodC e rPLD ou rNanH, rSodC e rPLD à cepa T1 da bactéria *C. pseudotuberculosis* para imunizar ovinos, e sua correlação à produção de IgG e IFN- γ . No entanto, algumas etapas desse estudo tornaram os resultados inconclusivos, visto que não foi utilizado um grupo controle negativo, a quantidade de ovinos utilizados foi de apenas três animais em cada grupo, e a ausência de análise histopatológica que pudesse indicar lesões despercebidas quando apenas exame macroscópico é realizado.

Apesar de não terem sido observadas lesões macroscópicas nos órgãos internos (pulmões, fígado, rins e baço) analisados no G1 e G2, aqui, no presente estudo, a análise

microscópica foi capaz de revelar imunidade protetora da formulação vacinal, especialmente nos pulmões através da obtenção de resultados em que os ovinos vacinados apresentaram índice de redução de lesões relativa de 100% na análise microscópica dos pulmões (Tabela 3).

Estes dados estão de acordo com um estudo anterior que mostrou na infecção experimental de ovinos com *C. pseudotuberculosis* o desenvolvimento de lesões apenas em pulmões e linfonodos (BRODGEN et al., 1984). De fato, mesmo em ovinos naturalmente infectados afetados pela forma visceral de LC, as lesões no sistema respiratório são mais frequentes (RUIZ et al., 2020).

A capacidade de uma vacina de subunidade em reduzir lesões pulmonares já havia sido anteriormente demonstrada em estudo com o de Fontaine e colaboradores (2006) em que a rPLD foi utilizada demonstrando proteção contra lesões pulmonares em ovinos, e no estudo de Walker e colaboradores 1994 onde ovinos vacinados com duas doses de 100 µg de uma vacina com antígeno de 40 kDa em adjuvante de Al(OH)₃ foi capaz de induzir 98% redução nas lesões pulmonares, o que reforça esta estratégia vacinal como promissora contra LC.

É importante destacar que quando *C. pseudotuberculosis* está presente nos pulmões, o microrganismo pode ser transmitido através de secreções respiratórias (secreção nasal ou tosse) e o animal pode apresentar sinais clínicos de doenças respiratórias como dispneia, taquipneia e tosse crônica, além da perda de peso crônica (PUGH; BAIRD 2012). Assim, a prevenção de lesões pulmonares pode ajudar a reduzir os níveis de LC por via aérea nos rebanhos.

As lesões nos pulmões só puderam ser observadas microscopicamente, como visto na Tabela 3. No grupo controle (G1), dois ovinos apresentaram pneumonia intersticial moderada, dois ovinos apresentaram pneumonia intersticial moderada e congestão, e dois ovinos apresentaram aspecto normal. Em contrapartida, nenhum dos ovinos do G2 apresentou lesões, o que resultou em um índice de lesões de redução relativa significativo de 100% em ovinos vacinados.

De acordo com Baird e Fontaine (2006) os pulmões são os órgãos mais afetados em animais infectados pela *C. pseudotuberculosis* com desenvolvimento de pneumonia e congestão vascular durante a infecção. Eles relataram pela primeira vez em 2006 a proteção estatisticamente significativa em ovinos imunizados com rPLD heterólogo expresso, mostrando redução nas lesões de linfonodos e pulmões, corroborando com os resultados aqui encontrados. A combinação de rPLD geneticamente mutado proporcionou proteção total (100%) contra lesões em gânglios linfáticos de ovinos desafiados com *C. pseudotuberculosis*

demonstrado por Sá e colaboradores. Aqui foi possível observar esta redução significativa de 100 % das lesões pulmonares, o que indica que a formulação vacinal exerce uma boa proteção contra lesões nos pulmões.

Com relação às lesões macroscópicas dos linfonodos, o grupo vacinado obteve um índice de indução de lesão de menor que o do grupo controle, indicando que os animais que receberam a dose da vacina multiproteica ficaram menos susceptíveis ao desenvolvimento de lesões. Esses dados são de grande relevância, uma vez que prevenir a formação de abscessos é o principal objetivo da imunoprevenção para a linfadenite caseosa.

As lesões macroscópicas e microscópicas encontradas nos linfonodos de cada ovino foram resumidas na Tabela 1 e na Tabela 2, respectivamente. As lesões macroscópicas foram significativamente maiores para os linfonodos dos animais do G1, resultando em um índice de redução relativo significativo de 86,36% no grupo G2. As lesões microscópicas também foram significativamente maiores para os animais do G1, resultando em um índice de redução relativa significativa de 80,77% no G2. Uma diferença estatística foi encontrada nos linfonodos pré-escapulares e parotídeos para lesões macroscópicas e microscópicas (Fig. 2 e Fig 3).

A avaliação da resposta imune humoral demonstra o aumento significativo nos níveis de IgG anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP09720 sendo observado a partir do 21º dia experimental, denotando o efeito da primeira dose da formulação multiproteica. Os maiores valores significativos dos níveis de IgG anti-rPLD, anti-rCP01850 e anti-rCP09720 permaneceram até o final do experimento, representando uma resposta imune humoral sustentada induzida pela composição vacinal, sugerindo um período relativamente longo com imunidade humoral duradoura. Apesar da diferença significativa, aparentemente há uma tendência descendente nos níveis de IgG anti-rCP09720, enquanto há uma tendência para que os níveis de IgG anti-rPLD e anti-rCP01850 sejam mantidos por um longo período de tempo de acordo com a figura 1.

Estudos anteriores como o de Bastos e colaboradores utilizando anticorpos anti-PLD específicos já tinham demonstrado a capacidade desse anticorpo em evitar a propagação de *C. pseudotuberculosis*. Sabe-se que tanto a imunidade humoral quanto a celular, com imunofenótipo tipo Th1, são necessários para proteção contra CLA. Embora os anticorpos IgG ajudem a proteger os animais contra infecção, neutralizando, opsonizando e ativando o sistema complemento, ativação de células CD8⁺ e a secreção de IFN- γ poderiam controlar

células infectadas e disseminação de bactérias na fase inicial do processo de infecção (BASTOS et al., 2012).

Assim, esses resultados sugerem que uma avaliação da resposta imune celular é o próximo passo para caracterizar melhor a resposta imune induzida por esta formulação vacinal.

O progresso com os avanços nos estudos para desenvolvimento de uma formulação vacinal mais segura e eficaz contra a LC especialmente na última década com uma variedade de proteínas recombinantes tem sido demonstrado com experimento em camundongos. Mas a falta de testes nas espécies-alvo fez com que poucos produtos novos chegassem ao mercado. Com isso, os resultados aqui demonstrados com o teste na espécie-alvo trazem novas possibilidades e avanços para o campo da vacinologia aplicada a LC.

7 CONCLUSÃO

A vacina recombinante multiproteica formulada com rPLD, rCP01850, rCP09720 e saponina, protegeu significativamente os ovinos desafiados contra o *C. pseudotuberculosis*, reduzindo lesões em linfonodos e pulmões e induzindo uma produção de IgG que se manteve por pelo menos 12 semanas após a vacinação. Assim, esta estratégia vacinal com antígenos recombinantes de subunidade deve ser considerada uma alternativa promissora para ser utilizada contra a linfadenite caseosa em ovinos.

REFERÊNCIAS

- AFTABUZZAMAN, M. D; CHO, YONG-IL. Recent perspectives on caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats-A review. **Korean Journal of Veterinary Service**, v. 44, n. 2, p. 61-71, 2021.
- ALVES, J. R. A. et al. Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-8, 2020.
- ALVES, F. S. F. et al. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos**, n. 74, 2007.
- ARAÚJO, C. L. et al. Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. **Gene**, v. 702, p. 36-45, 2019.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.
- BARRAL, T. B.; KALIL, M. A.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; GISMENE, C.; SOUSA, F. S.; COLLARES, T.; SEIXAS, FABIANA K; BORSUK, SIBELE; ESTRELA-LIMA, A.; AZEVEDO, V.; NASCIMENTO, R. J. M.; PORTELA, RICARDO W. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. **Applied microbiology and biotechnology**, v. x, p. 1-17, 2022.
- BARBOSA, T. N.; SILVA, M. T. O.; PINHO, R. B.; SCHOLL, N. R.; DE PEREIRA, CLAUDIO MARTIN PEREIRA; MANSILLA, A.; DELAGOSTIN, O. A.; BORSUK, S. Characterization of the adjuvant activity of lipid extracts of *sarcopeltis skottsbergii* and *iridea cordata* associated with recombinant protein rcp01850 as an immunogen against caseous lymphadenitis. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 7, p. e2023018, 2023.
- BARNABÉ, N. N. C. *et al.* Assessment of caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 2655–2668, 2020.
- BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. D., DORELLA, F. A., RIBEIRO, D., SEYFFERT, N., CASTRO, T. L. D. P. & AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **Journal Clinical & Cellular Immunology**, 4, 1- 15. 2012.
- BEZERRA, F. S. B. et al. The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104354, 2020.
- BEZERRA, F. S. B.; SILVA, M. T. O.; REZENDE, A. F. S. et al. Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, [s. l.], v. 39, n. 18, p. 2568–2574, 2021.

BOUSSIOTIS, V. A.; TSAI, E.Y. YUNIS, E. J, *et al.* IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest** 2000; 105: 1317-25.

BROGDEN, K. A.; CUTLIP, R. C; LEHMKUHL H. D. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Am J Vet Res** 1984;45:1532–4.

BRUM, A. A. et al. A esterase recombinante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em vacinas de DNA e subunidades recombinantes protege parcialmente os camundongos contra o desafio. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 5, pág. 635-642, 2017.

CALDERÓN, V.C.W.G.; ROCHA FILHO, J.T.R., SÁ, M.C.A DE, BASTOS, B.L, TRINDADE, S.C.; CAVALCANTE, NA DA S. , FARIAS, A.P.F. DE ., WAGNER DIAS PORTELA , R. ., PORTELA , RWD., AZEVEDO, V. ., & MEYER, R. . Avaliação de antígenos por ensaio imunoenzimático ELISA durante infecção experimental em caprinos com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento. 2022.

COMBS, D. J.; LU, Z.; Sphingomyelinase D inhibits store-operated Ca^{2+} entry in T lymphocytes by suppressing ORAI current. **J Gen Physiol** 1 August; 146 (2): 161–172, 2015.

CHIRINO-ZARRAGA, C. et al. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, p. 170-175, 2006.

COSTA, M.P.; MCCULLOCH, J.A.; ALMEIDA, S.S.; DORELLA, F.A.; FONSECA, C.T.; OLIVEIRA, D.M.; TEIXEIRA, M.F.; LASKOWSKA, E.; LIPINSKA, B.; MEYER, R.; et al. Molecular Characterization of the *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Hsp60-Hsp10 Operon, and Evaluation of the Immune Response and Protective Efficacy Induced by Hsp60 DNA Vaccination in Mice. **BMC Res. Notes** 4, 2–11, 2011.

COSTA, L. et al. Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 4, p. 796-803, 2020.

CORRÊA, J. I.; ROCHA FILHO, J. T. R.; BASTOS, B. L.; BONASPETTI, D. M.; MATOS, J. M. G.; SPANHOLI, E. F. .; FARIAS, A. P. F. de .; MOURA-COSTA, L. F. de .; TRINDADE, S. C. .; NASCIMENTO, R. J. M. . Gene expression of *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence factors and their role in the pathogenesis of caseous lymphadenitis. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. e132111436061, 2022.

CHRISTENSEN, D. Vaccine adjuvants: why and how. **Hum Vaccin Immunother** 2: 2709 – 2711. 2016.

DE FARIAS A.E. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES F. S. F.; PINHEIRO R. R; FACCIOLI-MARTINS P.Y.; LIMA, A. M.C.; DE AZEVEDO, S.S.; ALVES C.J. Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod.** 2019.

DE PINHO, R. B. et al. A novel approach for an immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection: An *Escherichia coli* bacterin expressing phospholipase D. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104746, 2021.

DE SÁ, M. C. A. et al. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 133, 2018.

DORELLA, A. D. et al.; Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development, **Expert Review of Vaccines**, 8:2, 205-213, 2009.

DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W.L.P.; SILVA, K.K.O. et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p. 1091– 1096, 2016.

DROPPA-ALMEIDA, D. et al. Response with TH1 profile obtained in vaccine formulation against Caseous Lymphadenitis in animal model C57 Black/6. **Biotechnology Research and Innovation**, p. 192-196, 2019.

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. **Australian Veterinary Journal**, p. 320-321, 1991.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; ALVES, F. S.F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: perespecificações no diagnóstico, tratamento e controle. 2014. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117061/1/CNPC-2014-Linfadenite>. Acesso em 15 de Setembro de 2022.

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33-34, p. 5986-5996, 2006.

GALVÃO, C. E. et al. Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. **BMC microbiology**, v. 17, p. 1-8, 2017.

GONG Z, MARTIN-GARCIA. J. M, DASKALOVA S. M, CRACIUNESCU F.M, SONG L, DORNER K., HANSEN D.T, YANG J.H, LABAER J, HOGUE B. G, MOR T.S, FROMME P. Biophysical characterization of a vaccine candidate against hiv-1: the transmembrane and membrane proximal domains of HIV-1 gp41 as a maltose binding protein fusion. 2015.

GUIMARÃES, A. DE S., DO CARMO, F. B., PAULETTI, R. B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. & amp; GUIMARÃES G. A. M. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**. 2(2). p. 33–43 , 2011.

LAN, D. T. B., MAKINO, S. I., SHIRAHATA, T., YAMADA, M., & NAKANE, A. Complement receptor type 3 plays an important role in development of protective immunity to primary and secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and immunology**, 43(12), 1103-1106, 1999.

HODGSON, A. L. et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and Immunity**, p. 2900-2905, 1992.

HODGSON, A.; CARTER, K., TACHEDJIAN, M. KRYWULT, J. CORNER, L. A 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.

HOELZLE, L.E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M.M.; PHILIPP, W. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Vet Microbiol.** 2013.

IBGE (2022). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 21 de agosto de 2022.

LAN, D. T. B., 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.

MONTEIRO et al. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. Texto para discussão **IPEA** v.1, p. 9, 2021.

MOREIRA, C.; DA CUNHA, C.E.P.; MOREIRA, G.M.S.G.; MENDONÇA, M.; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D, *Anaerobe* 40. 58–62. 2016.

MOREIRA, L.S.; LOPES, N.D.R.; PEREIRA, V.C.; ANDRADE, C.L.B.; TORRES, A.J.L.; RIBEIRO, M.B.; FREIRE, S.M.; DOS SANTOS, R.M.; D'ÁVILA, M.; NASCIMENTO, R.M.; et al. The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Vaccines**, 10, 1406, 2022.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia** v.17, n.2, p.200- 213. 2010.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Avaliação da resposta imune humoral e celular a diferentes antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos Canindé e sua potencial proteção contra linfadenite caseosa. **Imunologia e imunopatologia veterinária**, v. 126, n. 1-2, pág. 131-141, 2008.

MOUSSA, I. M.; ALI, M. S.; HESSAIN, A. M.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; SELIM, S. A. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n.23, p.718-723, 2016.

NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian J Med Biol Res** 2012;45(12):1102–11.

NETO, J. M. S. Caracterização dos sistemas de produção da ovinocaprinocultura no nordeste brasileiro. 2015.

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p. 129–139. 2003.

PINHEIRO, R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras MedVet Zootec.* 52: 534–543, 2000.

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

PUGH, D.G.; BAIRD, A. N. Sheep and Goat Medicine. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2012.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** Bailliere Tindall Ltd, 1994.

REZENDE, A. de F. S. *et al.* In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. *Journal of Medical Microbiology*, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 521–529, 2016.

REZENDE, A. F. S.; BRUM, A. A.; BEZERRA, F. S. B. et al. Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. *Braz J Vet Anim Sci.* v. 72, n. 1, p. 199- 207, 2020.

RODRIGUES, R. R.; FERREIRA, M. R. A; DONASSOLO, R. A et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. *Anaero*. 69. p. 102326. 2021.

RIBEIRO, D.; ROCHA, F.; LEITE, K.M.; et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Veterinary Research*, v. 45, p. 28, 2014.

RUIZ, H.; FERRER, L.M.; RAMOS, J.J.; , BASELGA C, ALZUGUREN O, TEJEDOR M.T, et al. The relevance of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. *Animals*;10:1–13. doi:10.3390/ani10111962, 2020.

SANTANA-JORGE, K.T.O.; SANTOS, T.M.; TARTAGLIA, N.R.; AGUIAR, E.L.; SOUZA, R.F.S.; MARIUTTI, R.B.; EBERLE, R.J.; ARNI, R.K.; PORTELA, R.W.; MEYER, R.; et al. Putative Virulence Factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: Vaccine Potential and Protein Expression. *Microb. Cell Fact.* 2016.

SANTOS, A.R.; PEREIRA, V. B.; BARBOSA, E.; BAUMBACH, J.; PAULING J et al. Mature epitope density – a strategy for target selection based on immunoinformatics and exported prokaryotic proteins. *BMC Genomics* 14:S4. 2013.

SCHOLL, N. R.; SILVA, M. T. DE O.; BARBOSA, T. N.; DE PINHO, R. B.; ALVES, M. S. D.; PORTELA, R. W.; AZEVEDO, V. A. DE C.; BORSUK, S. Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. *Vaccines*, v. 11, 2023.

SELMIM, S. A.; GHONEIM, M. E.; MOHAMED, Kh F. Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. **Int J Microbiol Res**, v. 1, n. 3, p. 129-136, 2010.

SEYFFERT N, GUIMARÃES, A.S., PACHECO, L.G; PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M.; MEYER, R., MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Alta soroprevalência de linfadenite caseosa em rebanhos caprinos brasileiros revelada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* ELISA baseado em proteínas segregadas. **Res Vet Sci**, 88:50–55, 2010.

SILVA, J. W.; DROPPA-ALMEIDA, D.; BORSUK, S. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 Recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis, **BMC Veterinary Research**, v.10, p.1–8, 2014.

SILVA, M. T. O.; BEZERRA, F. S. B.; PINHO, R. B. et al. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v.36, p.74-83, 2018.

SILVA M. T. O.; DE PINHO, R. B.; DA ROCHA, B. F.; BEZERRA, F. S. B; FERNANDA, S. S. S.; KOMMLING S. F.; COLLARES, T.; ROBERTO, J. M. N.; PORTELA, R. W. ; VASCO, A. C. A.; BORSUK, S. NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **vaccine**, v. 38, p. 8099-8106, 2020.

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

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 469-478, 2003.

SOUZA, M. F.; CARVALHO, A. Q.; JÚNIOR, G. F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslançados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31(3), p. 224-230, 2011.

TREGONING, J. S., Russell, R. F., & Kinnear, E. Adjuvanted influenza vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 14(3), 550-564, (2018).

VALE, V., FREIRE, S., RIBEIRO, M., REGIS, L., BAHIA, R., CARMINATI, R., PAULE, B. J. A., NASCIMENTO, I., & MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 2(2), 192–200, 2003.

VICH. VICH and its role for authorisation of veterinary medicinal products Executive Summary, 2010. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/VICH/VICH_and_its_role_for_authorisation_of_VMPs_Eng.pdf . Acesso em 08 Setembro de 2023.

YOZWIAK, M. L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am J Vet Res* 54: 392-397. (1993)

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

WINDSOR, P. A. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia and the need for persistent vaccination. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, London, v. 5, p. 1-12, 2014.

VACINAS RECOMBINANTES DE SUBUNIDADE CONTRA A LINFADENITE CASEOSA: UMA MINI-REVISÃO

RECOMBINANT SUBUNIT VACCINES AGAINST CASEOUS LYMPHADENITIS: A MINI-REVIEW

Janpson Allan Ribeiro Gurgel

Mestrando no Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN

<https://orcid.org/0000-0002-2956-4534>

*Autor correspondente, e-mail: janpson.gurgel@alunos.ufersa.edu.br

Mônica Ellen da Costa Soares

Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN

<https://orcid.org/0009-0009-8796-1069>

Thiago Vinícius Santos e Alves

Graduado em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN

<https://orcid.org/0000-0003-0643-2691>

Lenise Maria Parente Mota

Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN

<https://orcid.org/0009-0005-6687-7846>

Ana Karolina Melo Oliveira Barros

Graduada em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3989-1573>

Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Docente do Departamento de Biociências, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN

<https://orcid.org/0000-0001-6484-143X>

RESUMO

O uso de proteínas recombinantes no desenvolvimento de plataformas vacinais contra a linfadenite caseosa (LC) vem se destacando. Com o uso da bioinformática é possível prever através de softwares alvos potencialmente antigênicos minimizando os custos e o uso de animais durante o desenvolvimento de um novo desenho vacinal. Algumas vacinas comerciais para a LC já existem disponíveis no mercado, porém nenhuma das formulações oferecem uma proteção em caprinos e ovinos, que seja capaz de eliminar a doença dos rebanhos. Dessa forma, estudos envolvendo diversos alvos em vacinas experimentais vem sendo desenvolvidos na busca de uma resposta imune protetora contra o *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Nesta mini-revisão serão abordados a utilização de antígenos, adjuvantes, vias de administração, modelos animais e níveis de proteção alcançados em estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas para a linfadenite caseosa, descrevendo também os novos desafios e perspectivas futuras.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Proteínas recombinantes; Bioinformática.

ABSTRACT

The use of recombinant proteins in the development of vaccine platforms against caseous lymphadenitis (CL) has been gaining prominence. With the use of bioinformatics, it is possible to predict potentially antigenic targets through software, minimizing costs and the use of animals during the development of a new vaccine design. Some commercial vaccines for CL are already available on the market; however, none of the formulations provide protection in goats and sheep capable of eliminating the disease from herds. Thus, studies involving various targets in experimental vaccines are being developed in the search for a protective immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. This mini-review will address the use of antigens, adjuvants, administration routes, animal models, and levels of protection achieved in studies involving the development of vaccines for caseous lymphadenitis, also describing the new challenges and future perspectives.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Recombinant proteins; Bioinformatics.

INTRODUÇÃO

O uso de proteínas recombinantes no desenvolvimento de plataformas vacinais contra a linfadenite caseosa (LC) vem se destacando. Com o uso da bioinformática é possível prever através de softwares alvos potencialmente antigênicos minimizando os custos e o uso de animais durante o desenvolvimento de um novo desenho vacinal. Considerando a baixa quantidade de antígenos vacinais realmente expressos e testados em vacinas para a LC a caracterização de novos antígenos é essencial para o desenvolvimento de novas vacinas, bem como aperfeiçoamento das existentes (DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2012).

Algumas vacinas comerciais para a LC já existem disponíveis no mercado, porém nenhuma das formulações oferecem uma proteção em caprinos e ovinos, que seja capaz de eliminar a doença dos rebanhos. As vacinas atuais exigem o uso de doses de reforço constantes implicando em maior custo para os criadores, dificuldade de adesão aos protocolos de vacinação corretamente, e aumento da possibilidade do desenvolvimento de efeitos colaterais nos animais (DE PINHO *et al.*, 2021). Além disso a segurança dessas vacinas ainda é questionável, uma vez que ainda é observa-se a formação de abscessos em animais após a vacinação (LEAL *et al.*, 2018).

Justamente visando sanar esta lacuna da segurança e elevar os níveis de eficácia das vacinas contra a LC é que alguns grupos de pesquisa de universidades brasileiras como UFPel, UFBA, UFMG e UFERSA tem se dedicado ao desenvolvimento científico e tecnológico na

área da vacinologia aplicada à LC. Assim, na última década, tem se elevado o número de publicações científicas, bem como de patentes depositadas com enfoque no desenvolvimento de estratégias vacinais diversificadas e mais modernas.

Dada a importância supramencionada de *C. pseudotuberculosis*, não surpreende o fato de que muitos genomas da espécie foram sequenciados nas últimas décadas (até o dia 22/06/2023 estavam disponíveis 172 genomas da espécie no repositório do NCBI), os quais geraram uma grande quantidade de dados que vem estimulando o desenvolvimento de estudos de genômica comparativa, imunoinformática e proteômica com o objetivo de predizer novos alvos vacinais (ARAÚJO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2021; DORELLA *et al.*, 2009; MÖLLER *et al.*, 2022; REZENDE *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2012).

Deste modo, nessa mini-revisão tentaremos demonstrar brevemente sobre o estado da arte em relação ao desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a LC.

A LINFADENITE CASEOSA

A LC é uma doença zoonótica, infectocontagiosa, crônica e debilitante em ovinos e caprinos que tem distribuição mundial e alta prevalência em rebanhos de pequenos ruminantes, sendo responsável por um alto índice de perdas econômicas aos produtores no setor pecuário (DORELLA *et al.*, 2009).

Dados da última Pesquisa Pecuária Municipal divulgados pelo IBGE, realizada em 2021, revelaram que o Brasil possui 20.537.474 cabeças de ovinos e 11.923.630 cabeças de caprinos, estando 69,9% desses ovinos e 95,2% desses caprinos concentrados na região Nordeste (IBGE, 2023). Esses números se refletem no impacto econômico exercido pela ovinocaprinocultura no contexto do agronegócio, especialmente na geração de emprego e renda e fixação do homem no campo (MONTEIRO; BRISOLA e VIEIRA FILHO, 2021). Neste cenário a LC ganha destaque por ser um dos principais problemas sanitários que afetam negativamente a atividade, com redução da produtividade dos rebanhos. Para se ter uma ideia, somente na região Nordeste, a prevalência estimada de LC em caprinos é de 30,3%, com cerca de 87,8% das propriedades possuindo animais infectados (DE FARIAS *et al.*, 2019). Em nível de Brasil, a LC é uma doença endêmica de caprinos e ovinos, e sua prevalência clínica de aproximadamente 30% (SEYFFERT *et al.*, 2010). Além disso, estima-se que as perdas econômicas somente durante a etapa de abate de caprinos sejam da ordem de 6,09% em virtude da condenação de carcaças (BARNABÉ *et al.*, 2020).

O microrganismo causador dessa doença é a bactéria gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a qual é responsável pela formação de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais em sua forma cutânea como também nos gânglios linfáticos internos em sua forma visceral. Durante seu ciclo infeccioso, esta pode se disseminar por vários órgãos do animal infectado como fígado, baço, rins e pulmões o que agrava o quadro do animal resultando em perda de peso, diminuição da produção de lã, leite e diminuição do desempenho reprodutivo, além de perdas econômicas devido ao abate dos animais (FACCIOLI-MARTINS, 2014; BAIRD e FONTAINE, 2007).

A transmissão da LC acontece no ambiente pelo contato direto entre animais saudáveis e doentes através do exsudato proveniente dos abscessos supurados de animais infectados que eliminam bactérias viáveis capazes de penetrar pela pele lesionada e promover a infecção de um rebanho inteiro. Além disso o patógeno pode permanecer no ambiente por vários meses, o que implica na sua disseminação pela água contaminada, pelo solo e alimentos (SOUZA *et al.*, 2011). Após penetração do *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro inicia-se a contaminação e durante esta que a bactéria é carregada dentro de células fagocíticas, o que mais tarde culminará no desenvolvimento de um granuloma formado por células do sistema imunológico e as bactérias infectantes, a evolução deste processo é capaz de causar lesões na forma de necrose caseosa (BASTOS *et al.*, 2012).

DESAFIOS NO TRATAMENTO E CONTROLE

Uma vez que um rebanho é infectado pelo agente causador da LC torna-se difícil sua erradicação, já que o tratamento com antibióticos é ineficiente. Com a formação dos granulomas, a barreira celular na forma de biofilmes impossibilita a penetração dos medicamentos, e assim a utilização destes se torna dificultada. Além disso, do ponto de vista econômico esse tipo de tratamento torna-se inviável, já que estes acabam onerando os criadores de animais (DORELLA *et al.*, 2009).

Assim, o método mais utilizado no controle da LC é o procedimento cirúrgico através da drenagem dos abscessos superficiais seguida da limpeza e cauterização química com Iodo 10%. Porém este só é possível em casos de LC superficial, sendo inviável para os abscessos internos, que, por não serem tratados, continuam a disseminar o patógeno, tornando esse método uma medida ineficaz (DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2018).

Levando-se em conta o cenário atual onde os tratamentos disponíveis são ineficazes e inviáveis economicamente para alguns produtores a estratégia mais adequada para o controle e

prevenção da LC consiste na vacinação dos animais saudáveis associada a outras medidas de manejo sanitário de todo o rebanho, como isolamento e retirada do rebanho de animais infectados (DORELLA *et al.*, 2009). Mesmo sabendo-se que, atualmente, vacinar um rebanho inteiro não elimina a possibilidade de infecção, verifica-se que essa prática colabora para uma redução significativa do número de animais que desenvolvem lesões, reduzindo substancialmente a transmissão e níveis de infecção. Além disso, ao passo que os animais mais velhos são abatidos, com o tempo, o desafio infeccioso diminui, o que significa que menos animais serão infectados diminuindo a probabilidade de infecção de outros animais (WINDSOR *et al.*, 2014).

VACINAS PARA LINFADENITE CASEOSA

A busca por uma vacina eficaz para LC tornou-se recorrente pela possibilidade de diferentes recursos estratégicos com tecnologias que vão desde vacinologias tradicionais como toxóides, bacterina e bactérias vivas atenuadas, até as estratégias mais modernas como as vacinas de subunidades recombinantes, DNA e vetoriais as quais têm sido utilizadas na tentativa de induzir imunidade adequada e alta proteção (DE PINHO *et al.*, 2021).

Atualmente a maioria dos estudos que buscam desenvolver formulações de vacinas utiliza genes bacterianos (vacinas de DNA) ou proteínas bacterianas (vacinas de subunidades), porém para o desenvolvimento destes tipos vacinais são necessários estudos para identificar genes relacionados à virulência da bacteriana. (GALVÃO *et al.*, 2017). Um dos fatores de virulência mais explorados em testes vacinais para LC é a proteína fosfolipase D (PLD), que é a principal exotoxina produzida pelo *C. pseudotuberculosis*, considerada seu antígeno imunodominante, atua facilitando a infiltração e disseminação de *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, limita a opsonização bacteriana, permitindo que as células bacterianas escapem da fagocitose, inibe a entrada de Ca^{2+} em células T e reduz a produção de interleucina (IL) -2, que é essencial para a proliferação de crescimento de células T e produção de fator de necrose tumoral- α (DE PINHO *et al.*, 2021).

A maioria das vacinas licenciadas que estão disponíveis são compostas por antígenos conjugados a outros patógenos com o intuito de aumentar o estímulo da resposta imunológica, porém, nenhuma das estratégias desenvolvidas até agora apresentou eficácia significativa em pequenos ruminantes (DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2019). Mas existem também formulações vacinais com outras composições como é o caso das vacinas vivas atenuadas composta somente pelo *C. pseudotuberculosis*, um exemplo disso é a vacina desenvolvida no Brasil que foi

licenciada no ano de 2000, baseada na linhagem 1002 atenuada com sua fabricação pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (PATON *et al.*, 2003). Entretanto apesar de demonstrar em testes experimentais uma taxa de proteção de 83% nos animais, esses índices não são demonstrados em campo, além disso, esse tipo de formulação apresenta alguns impasses como a indução de efeitos colaterais nos animais que vão desde a formação de granuloma cutâneo, edema e febre, como queda na produção de leite (RIBEIRO *et al.*, 2014).

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS DE SUBUNIDADES RECOMBINANTES

Com o intuito de minimizar efeitos adversos e maximizar a eficácia, outras estratégias vacinais foram idealizadas e a busca por novos alvos antigênicos ganhou incentivo. Dentre várias formulações estudadas, as formulações utilizando proteína recombinantes foram desenvolvidas na busca de se obter resultados mais seguros e eficazes (SILVA *et al.*, 2014). Para o desenvolvimento desses tipos vacinais, são necessários estudos para identificar genes relacionados à virulência bacteriana e com isso utilizar a engenharia genética para que codifiquem possíveis proteínas antigênicas (DORELLA *et al.*, 2009).

A busca por uma maior eficácia das formulações vacinais para a LC foi impulsionada pelo advento da bioinformática e o sequenciamento do genoma, através deles tornou-se possível selecionar prováveis candidatos vacinais a partir da informação genômica identificando alvos potencialmente antigênicos, como também foi possível predizer a quantidade de proteína madura que é capaz de desencadear uma resposta imune pelo o uso da análise MED – Densidade de Epítomos Maduros, e assim alcançar resultados mais promissores na busca do desenho vacinal ideal (DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2021; REZENDE *et al.*, 2016). Assim os métodos vacinais tradicionais como o uso de toxóides, bacterinas e bactérias vivas atenuadas, vão dando espaço a estratégias mais modernas como a vacinologia reversa, vacinas de subunidades recombinantes, vacinas de DNA e vetoriais as quais têm sido utilizadas na tentativa de induzir imunidade adequada e alta proteção (DE PINHO *et al.*, 2021).

As vacinas de subunidades recombinantes aparecem em um cenário em que são consideradas seguras quando se trata da indução de efeitos colaterais, pois geralmente apresentam níveis mais baixos desses efeitos resultando em taxas de proteção variáveis dependendo do antígeno empregado ou da combinação deste com um adjuvante (BRUM *et al.*, 2017). Vale ressaltar que a produção desse tipo vacinal requer etapas de isolamento purificação e desintoxicação o que torna esse processo com mais custos para a indústria, porém outras

estratégias podem ser utilizadas visando eliminar a etapa da purificação da proteína recombinante reduzindo o tempo e o custo da produção (MOREIRA *et al.*, 2016).

Estudos mostram que apesar das vacinas baseadas em proteínas recombinantes ofereçam inúmeras vantagens em relação às vacinas tradicionais dentre elas o custo de produção e maior segurança, a maioria delas são pouco imunogênicas. Tendo em vista a alta pureza desse tipo de vacina, eventos adversos induzidos pela vacina tornam-se menos prováveis. Em contrapartida, a imunogenicidade tende a ficar diminuída com o aumento da purificação, o que torna o uso de adjuvantes vacinais mandatório (CHRISTENSEN, 2016).

Algumas vacinas de subunidade recombinantes já foram produzidas e testadas contra a LC com várias abordagens diferentes dentre elas uma formulação que utilizou a PLD geneticamente inativada, a qual protegeu 44% dos ovinos quando desafiados contra a *C. pseudotuberculosis* (HODGSON *et al.*, 1999). Outra proteína recombinante a rHSP60 foi testada como imunizante em camundongos a qual não rendeu bons resultados pela morte dos animais em somente duas semanas após o desafio com cepa virulenta (PINHO *et al.*, 2009). Uma serina protease recombinante rCP40 foi testada em camundongos estando associada a dois adjuvantes diferentes a qual demonstrou propriedades imunogênicas gerando taxa de proteção até 100%, apresentando resultados bastante promissores (SILVA *et al.*, 2014; DROPPA-ALMEIDA *et al.*, 2016).

Após o genoma da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* ter sido depositado no GeneBank em 2015, outros alvos que não haviam sido testado ainda ganharam espaço entre novas pesquisas. Em 2018 a combinação dos antígenos: rCP01850 e rCP09720 associados com a rPLD de forma isolada foram associadas ao adjuvante saponina para avaliar a resposta imune humoral e celular, onde foi verificado que essas duas formulações foram capazes de induzir proteção parcial de 40% e 50% em camundongos quando desafiados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, o que demonstrou o sinergismo de rPLD com duas proteínas de subunidade, visto que essa exotoxina apresentou uma taxa de proteção de apenas 30% quando usada de forma isolada na formulação vacinal em estudos anteriores. Além disso, a combinação também demonstrou respostas imunes inatas e Th1 mais intensas caracterizadas por níveis mais elevados de IFN- γ e TNF em culturas de esplenócitos estimuladas com antígeno (SILVA *et al.*, 2018). Os resultados desse estudo sugeriram que a combinação rPLD + rCP01850 pode ser uma vacina potencial candidata a ser testada em ovinos e caprinos, uma vez que foi capaz de gerar uma resposta imune Th1 mais potente do que a observada nos outros grupos do experimento.

Outros alvos potencialmente antigênicos como o *cp1002_0369* e *cp1002_1957* foram identificados também através de abordagens imunológicas utilizando a bioinformática. Os

dados desses genes se encontravam disponíveis na anotação do genoma de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 realizada em janeiro de 2014 contudo em agosto de 2015 houve uma reanotação e os referidos genes passaram a ser identificados como *cp1002_RS01850* e *cp1002_RS09720*, respectivamente.

O gene da fosfatase ácida que apresenta 410 aminoácidos *cp_1002_RS01850* de *C. pseudotuberculosis* foi depositado no GeneBank sob a sequência de referência NCBI: WP_014400988.1 GI: 504213886. Já o gene da esterase formada por 341 aminoácidos denominado de *cp1002_RS09720* sofreu sua reanotação no GeneBank, sob o número de acesso WP_013242814 GI: 503007838.

Os estudos que envolveram a codificação da sequência da proteínas rCP09720 e rCP01850 para uso em vacinas de DNA e de subunidade recombinante foram realizados por inúmeros pesquisadores dentre eles Brum et al. (2017) que utilizam uma formulação baseada em rCP09720 associada a $Al(OH)_3$ a qual foi capaz de conferir um nível de proteção significativo contra desafio com a cepa virulenta MIC-6. Os resultados demonstraram uma proteção parcial de 58,3% da formulação vacinal. Já a vacina de DNA (pTARGET/cp09720) não foi capaz de conferir proteção significativa.

Em relação as formulações que envolvem a rCP01850 como vacina de subunidade recombinante, evidencia-se bons níveis de proteção com o uso desse antígeno através dos estudos de Silva (2018) em que foi avaliada a associação de rCP01850 com a exotoxina rPLD em uma formulação para avaliação da resposta humoral em camundongos a qual foi capaz de induzir proteção parcial (50%) dos camundongos após desafio com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Essa associação resultou na melhor proteção contra a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, visto que em um dos grupos do experimento houve imunização com a rPLD de forma isolada com obtenção da taxa de proteção de apenas 30%.

Outro estudo elaborado por Rezende (2020) utilizou o alvo *cp1002_RS01850* para construir uma vacina de DNA e subunidade recombinante para ser testada em camundongos os quais foram desafiados com a cepa virulenta MIC-6. A formulação vacinal foi composta pelo antígeno rCP1850 associado ao adjuvante $Al(OH)_3$ como vacina de subunidade recombinante e concluiu-se que essa associação aumentou a taxa de sobrevivência pós-desafio, por meio de uma indução do tipo de resposta imune mista Th1 / Th2.

Outro estudo inovador utilizou a própolis vermelha brasileira, tendo em vista suas propriedades imunomoduladoras. Testou-se o efeito adjuvante do óleo de própolis em uma vacina recombinante contra linfadenite caseosa. Bezerra *et al.* (2020) inocularam a formulação em camundongos os quais foram desafiados com cepa virulenta para determinação dos níveis

de IFN- γ e IL-10 após estimulação de esplenócitos com o antígeno recombinante. Após o desafio, o grupo vacinado apenas com a própolis vermelha brasileira apresentou uma taxa de sobrevivência de 20%, enquanto 70% dos camundongos do grupo imunizado com a combinação de própolis vermelha e rCP01850 sobreviveram ao desafio experimental o que pode concluir que a própolis vermelha usada sozinha tem propriedades imunoestimulantes, especialmente na resposta imune celular, e quando usado em combinação com a proteína recombinante rCP01850 induz respostas imunes celulares e humorais, bem como uma taxa de sobrevivência significativa.

Bezerra (2021) teve como propósito avaliar os três alvos mais bem avaliados na análise MED (*Mature epitope density*) em vacinas (rCP00660, rCP09720 e rCP01850) contra a LC combinados individualmente com a saponina como adjuvante vacinal e obteve proteção quando camundongos foram desafiados. A rCP01850 apresentou maior taxa de proteção (60%) e significativa em relação ao grupo controle quando comparado aos outros antígenos rCP00660 e rCP09720, que apresentaram taxas de proteção não significativas de 30% e 40% respectivamente.

Encontrar a combinação perfeita entre o antígeno e o adjuvante que venham a conferir um alto grau de proteção nos animais se torna o maior desafio para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante (REZENDE et al., 2020). Nos vários ensaios que buscam o aumento do potencial imunogênico da formulação vacinal, diferentes adjuvantes já foram testados em associação com proteínas recombinantes com o intuito de estimular a resposta imunológica do hospedeiro. De acordo com Rezende (2020) é necessário encontrar a melhor combinação entre antígeno e adjuvante para uma formulação vacinal ideal, até o momento já foram utilizados com essa finalidade de formulação de vacinas contra LC alguns, como: óleo mineral, complemento de freund, hidróxido de alumínio Al (OH)₃, saponina e própolis vermelha. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada em modelo murino, o que, apesar de ser uma etapa crucial no processo de avaliação de novos modelos ou procedimentos, dificulta a extrapolação de informações mais precisas para os animais-alvo para quais é estabelecido na infecção da LC (DE PINHO et al., 2021).

Tendo a vista a importância do adjuvante na formulação vacinal e que estes podem diminuir o número de doses de vacinas utilizadas para imunização e reduzir os custos de produção de vacinas, recentemente, Barbosa et al. (2023) utilizaram um de extrato lipídico de macroalgas subantárticas ainda não experimentado em formulações vacinais para avaliar se este apresentava efeito adjuvante quando associado a proteína recombinante rCP01850 em vacinas recombinantes para a LC. Assim, camundongos foram imunizados e avaliados quanto a

resposta imune humoral e celular, e, após desafio, foi verificado que a proteína recombinante CP01850, quando associada ao extrato lipídico, promoveu uma resposta imune humoral significativa, como também provocaram a produção de citocinas envolvidas na imunidade celular, o que condiz com uma resposta imune mista, indicando que a formulação de vacinal é capaz de proteger eficazmente os camundongos contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis*.

Os benefícios da utilização de formulações vacinais contendo mais de um antígeno foi demonstrado também em um estudo conduzido por Scholl *et al.* (2023) que avaliou o potencial imunogênico e a eficácia protetora das proteínas recombinantes rNanH e rPknG em modelo murino, utilizando estas proteínas por serem consideradas bons alvos pela análise MED na imunoprevenção contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis*. A NanH é uma proteína inserida na membrana bacteriana, tal fato facilita o reconhecimento do antígeno pelo sistema imunológico o que aumenta o seu potencial como alvo vacinal. Já a PknG é uma proteína quinase que atua impedindo a fusão fago-lisossomal permitindo que as bactérias se multipliquem e se desenvolvam no meio intracelular, motivo pelo qual mostra-se um possível alvo promissor (SANTANA-JORGE *et al.*, 2016).

O grupo de pesquisadores do referido estudo verificou que a formulação com essas proteínas associadas ao adjuvante saponina foi capaz de produzir proteção parcial nos animais desafiados, ao mesmo tempo em que geraram níveis significativos de anticorpos totais IgG. Estes caracterizaram uma resposta humoral mista com tendência ao tipo Th1. Com isso, concluem que essas formulações vacinais induzem possivelmente um fenótipo de resposta imune tipo Th1, mas propuseram como próximo passo a elucidação da resposta imune celular desencadeada.

Estes resultados são condizentes com o estudo de Silva (2020) que utilizou esses mesmos alvos para imunizar camundongos e avaliar a resposta humoral e chegou a conclusão que a formulação vacinal contendo rNanH e saponina foi capaz de gerar uma resposta imune Th1 mais pronunciada quando comparada com a formulação contendo o mesmo adjuvante e rPknG. A formulação vacinal contendo rNanH e saponina foi capaz de induzir proteção de 60%, o que trouxe como conclusão que esta formulação resultou na melhor proteção pós-desafio contra *C. pseudotuberculosis* quando comparado à vacinação com o mesmo adjuvante associado à proteína rPknG.

Estratégias utilizando proteínas de fusão também já foram testadas na busca por uma vacina mais eficaz. Como já eram conhecidos como alvos vacinais as proteínas PLD e CP40, em que se obteve resultados como produção significativa de anticorpos e ativação da resposta

imune celular respectivamente, um estudo realizado por Barral (2022) idealizou testar uma proteína de fusão utilizando estas associadas a proteína de ligação à maltose (MBP) por esta já ter sido descrita como um adjuvante intrínseco para proteínas de fusão (GONG *et al.*, 2015). Assim foi desenvolvida a proteína de fusão MBP:PLD:CP40 para ser avaliada sua imunogenicidade e propriedades de imunoprofilaxia *in silico* e *in vivo*. Os autores concluíram que essa proteína é um antígeno potencial para imunoprofilaxia da LC pois não possui potencial alergênico e contém múltiplos epítomos que podem ser reconhecidos pelos linfócitos B e apresentados aos linfócitos T através de moléculas MHC I e II (BARRAL *et al.*, 2022). As análises *in vivo* demonstraram uma taxa de sobrevida de 57,14% sendo superior ao valor obtido quando testado apenas a combinação de rCP40+rPLD, que apresentou 42,86% de proteção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A LC, uma doença crônica e debilitante que afeta ovinos e caprinos em todo o mundo, representa um desafio significativo para os produtores. A alta prevalência dessa doença em rebanhos de pequenos ruminantes resulta em perdas econômicas substanciais e afeta não apenas a produção animal, mas também a saúde pública, pois a LC é uma zoonose.

A vacinação de animais saudáveis torna-se a estratégia mais adequada para o controle e prevenção da LC, embora não seja uma solução definitiva. As vacinas comerciais existentes oferecem apenas proteção parcial e frequentemente têm questões de segurança, como a formação de abscessos nos animais. A busca por vacinas eficazes para a LC tem levado ao desenvolvimento de diferentes abordagens vacinais, incluindo vacinas de subunidades recombinantes e de DNA.

As vacinas de subunidades recombinantes surgem como uma alternativa promissora, oferecendo uma resposta imune mais segura e controlada. No entanto, essas vacinas muitas vezes carecem de imunogenicidade, o que exige a inclusão de adjuvantes na formulação. Além disso, a maioria dos estudos foi realizada em modelos murinos, dificultando a extrapolação dos resultados para o campo.

Apesar dos desafios, a pesquisa e a inovação continuam a impulsionar a busca por vacinas eficazes contra a LC. À medida que a ciência avança e novas descobertas são feitas, esperamos que seja possível desenvolver vacinas mais seguras e eficazes que possam contribuir para a redução da prevalência da doença, melhorando a saúde dos animais e a economia rural. A colaboração entre pesquisadores, produtores e autoridades de saúde animal é fundamental para enfrentar esse desafio complexo e de grande importância.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. L. *et al.* Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. **Gene**, v. 702, jun. 2019.
- BRUM, A. A. *et al.* A esterase recombinante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em vacinas de DNA e subunidades recombinantes protege parcialmente os camundongos contra o desafio. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 5, pág. 635-642, 2017.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.
- BARNABÉ, N. N. da C. *et al.* Assessment of caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 2655–2668, 2020.
- BARBOSA, T. N. *et al.* Characterization of the adjuvant activity of lipid extracts of *sarcopeltis skottsbergii* and *iridea cordata* associated with recombinant protein rcp01850 as an immunogen against caseous lymphadenitis. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 7, p. e2023018, 2023.
- BARRAL, T. B. *et al.* Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. **Applied microbiology and biotechnology**, v. x, p. 1-17, 2022.
- BASTOS, B. L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **Journal Clinical & Cellular Immunology**, 4, 1- 15. 2012.
- BEZERRA, F. S. B. *et al.* The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104354, 2020.
- BEZERRA, F. S. B. *et al.* Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2568-2574, 2021.
- CHRISTENSEN, D. Vaccine adjuvants: why and how. *Hum Vaccin Immunother* 2: 2709 – 2711.
- DA SILVA, Wanderson Marques *et al.* A journey through the *Corynebacterium pseudotuberculosis* proteome promotes insights into its functional genome. **PeerJ**, [s. l.], v. 9, 2021.
- DE FARIAS A.E. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES F. S. F.; PINHEIRO R.R.; FACCIOLI-MARTINS P.Y.; LIMA, A. M.C.; DE AZEVEDO, S.S.; ALVES C.J. Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod.**, 2019.

- DE PINHO, R. B. *et al.* Uma nova abordagem para um imunógeno contra a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*: uma bacterina de *Escherichia coli* expressando fosfolipase D. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104746, 2021.
- DORELLA, F. A. *et al.* Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, p. 205-213, 2009.
- DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W.L.P., SILVA, K.K.O. *et al.* Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p. 1091– 1096, 2016.
- DROPPA-ALMEIDA, D.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F. F. Immuneinformatic analysis and design of peptide vaccine from multiepitopes against *corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinform Biol Insights**, v. 12, p. 1–9, 2018.
- DROPPA-ALMEIDA, D. *et al.* Response with TH1 profile obtained in vaccine formulation against Caseous Lymphadenitis in animal model C57 Black/6. **Biotechnology Research and Innovation**, p. 192-196, 2019.
- DROPPA-ALMEIDA, D. *et al.* Epítomos imunodominantes de proteína putativa *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentam interações com TLR-2 in silico. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 29655-29670, 2021.
- EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. **Linfadenite Caseosa (LC)**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/zoossanitario-linfadenite>. Acesso em: 04 Jun.2023.
- FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; ALVES, F. S.F.; PINHEIRO, R. R; Linfadenite Caseosa: perespecificações no diagnóstico, tratamento e controle [Documento WWW]. URL.<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117061/1/CNPC-2014-Linfadenite.2014.pdf>.
- GALVÃO, C. E. *et al.* Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. **BMC microbiology**, v. 17, p. 1-8, 2017.
- GONG Z, MARTIN-GARCIA. J. M, DASKALOVA S. M, CRACIUNESCU F.M, SONG L, DORNER K., HANSEN D.T, YANG J.H, LABAER J, HOGUE B. G, MOR T.S, FROMME P. Biophysical characterization of a vaccine candidate against hiv-1: the transmembrane and membrane proximal domains of HIV-1 gp41 as a maltose binding protein fusion. 2015
- HODGSON, A. *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.
- IBGE (2022). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 21 de agosto de 2022.

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

MÖLLER, Jens *et al.* Multi-Omics of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* 12CS0282 and an In Silico Reverse Vaccinology Approach Reveal Novel Vaccine and Drug Targets. **Proteomes**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2022.

MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M.V.; VIEIRA FILHO, J. E. **Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil**. Texto para discussão. Rio de Janeiro: IPEA. 2021. 31p. E-book. Disponível em:
<http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10621/2/td_2660.pdf

MOREIRA, C.; DA CUNHA, C. E. P.; MOREIRA, G.M.S.G.; MENDONÇA, M.; SALVARANI, F.M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F.R., Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, n. 40, p. 58–62, 2016.

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**. 81:91–5, 2003.

PINHO, R. B.; SILVA, M. T. O.; BRENNER, G.; ALVES, M. S. D.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W. D.; BORSUK, S. A novel approach for an immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection: an *Escherichia coli* bacterin expressing phospholipase D. **microbial pathogenesis**, v. 151, p. 104746, 2021.

REZENDE, A. de F. S. *et al.* In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 521–529, 2016.

REZENDE, A. F. S. *et al.* Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 199-207, 2020.

RIBEIRO, D. *et al.* An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, v. 45, p. 28, 2014.

SANTANA-JORGE, K. T. O. *et al.* Putative Virulence Factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: Vaccine Potential and Protein Expression. **Microb. Cell Fact**. 2016.

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

SOARES, S. C. *et al.* PIPS: pathogenicity island prediction software. **PloS one**, 7(2), e30848. 2012

SCHOLL, N. R. *et al.* Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. **Vaccines**, v. 11, p. 519, 2023.

SEYFFERT, N. *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 50–55, 2010.

SILVA, J. W. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 Recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis, **BMC Veterinary Research**, v.10, p.1–8, 2014.

SILVA, M. T. O. *et al.* Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v.36, p.74-83, 2018.

SILVA M. T. O. *et al.* NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **vaccine**, v. 38, p. 8099-8106, 2020.

SOUZA, M. F.; CARVALHO, A. Q.; JÚNIOR, G. F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31(3), p. 224-230, 2011.

WINDSOR, P. A. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia and the need for persistent vaccination. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, London, v. 5, p. 1-12, 2014.

Vaccine

Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* challenge in sheep

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original article
Section/Category:	Veterinary Bacterial Vaccines
Keywords:	Caseous lymphadenitis; immunoprophylaxis; small ruminants; phospholipase D; rCP01850; rCP09720
Corresponding Author:	Francisco Silvestre Silvestre Brilhante Bezerra, Ph.D. Federal Rural University of the Semi-Arid Pelotas, Rio Grande do Norte BRAZIL
First Author:	Janpson Allan Ribeiro Gurgel, Graduated
Order of Authors:	Janpson Allan Ribeiro Gurgel, Graduated Mônica Ellen da Costa Soares, Graduated Thiago Vinicius Santos e Alves, Graduated Ana Karolina Melo Oliveira Barros, Graduated Lenise Maria Parente Mota, Graduate Student Gabriel Freitas de Macedo, Graduated Nicholas Silva dos Santos Filho, Graduated Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos, Master Tallyson Nogueira Barbosa, PhD Jael Soares Batista, PhD Sibele Borsuk, PhD Francisco Silvestre Silvestre Brilhante Bezerra, Ph.D.
Abstract:	Purpose: In the last decade many antigens of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> have been expressed and used in formulations as an attempt to find a safe and efficient vaccine to be used against CLA. In this study, a Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV) was tested in sheep to evaluate its ability of protection after <i>C. pseudotuberculosis</i> challenge and of inducing a humoral response. Methodology: For immunization and challenge assays, twelve male lambs (3-4-months-old) were randomly distributed in two groups of six animals each: G1, inoculated with saline solution 0.9% (negative control group); and, G2, inoculated with the Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV), formulated with rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin as adjuvant. Lambs were vaccinated twice with a 21-day interval and were challenged with <i>C. pseudotuberculosis</i> four weeks after the last immunization (day 49). Quantification of anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG was performed by indirect ELISA on days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment. Twelve weeks after challenge (day 133) animals were necropsied and the organs were macroscopically and microscopically examined. Results: A significant increase in anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels was detected for G2 from day 21 until the end of the experiment (day 133). Significant relative reduction for macroscopic and microscopic lesions in lymph nodes of 86,36 % and 80,77 %, respectively, were found for sheep vaccinated with MRV. No macroscopic lesions were found in internal organs. However, a protection of 100 % against microscopic pulmonary lesions was observed in G2. Conclusion: The MRV significantly protects sheep against lesions in lymph nodes and lungs and inducing increase in specific IgG levels for at least 12 weeks. So, MRV should be considered as a new and promising formulation to be used in sheep for CLA immunoprophylaxis.
Suggested Reviewers:	Mara Thaís de Oliveira Silva, PhD

	Expert, Polícia do Ceará marathaisos@gmail.com Expert in recombinant CLA vaccines
	Andréa de Fátima Silva Rezende, PhD Professor, Federal Institute of Education Science and Technology of Sergipe andrea.rezende@ifs.edu.br Expert in recombinant vaccines against CLA
	Silvana Beutinger Marchioro, PhD Professor, Federal University of Bahia silmarchioro@hotmail.com Expert in recombinant vaccines against CLA
	Ricardo Wagner Dias Portela, PhD Professor, Federal University of Bahia rwportela@ufba.br Expert in vaccines against CLA
	Fabiana Kommling Seixas, PhD Professor, Federal University of Pelotas seixas.fk@gmail.com Expert in vaccinology
	ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN, PhD Professor, Federal University of Pelotas odirad@gmail.com Expert in Vaccinology
	Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra, PhD Professor, Federal Rural University of the Semi-Arid anacarla@ufersa.edu.br Expert in small ruminant research
	Rodrigo Barros de Pinho, PhD Pos-Doctor, Federal University of Pelotas rodrigobpinho@hotmail.com Expert in Recombinant Vaccines against CLA
Opposed Reviewers:	Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, PhD Professor, Federal University of Minas Gerais vasco@icb.ufmg.br Personal reasons



Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva, Mossoró RN |
CEP: 59.625-900, +55 84 3317-8200

12nd January 2024.

Dear Dr. Gregory A. Poland
Editors-in-Chief of Vaccine

Enclosed with this letter you will find an electronic submission of the manuscript entitled **“Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* challenge in sheep”**. The manuscript describes the evaluation of the vaccinal formulation composed by rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin as adjuvant, as a Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV) against caseous lymphadenitis (CLA) in sheep model. Most of recombinant subunit vaccines developed until now were tested only in mice, and results in the target species are scarce.

In the paper we present attached to this letter, we showed that the MRV (G2) significantly protects lambs against *C. pseudotuberculosis* challenge in comparison to negative control group inoculated with saline solution (G1). After complete vaccinal schedule, and challenge with *C. pseudotuberculosis*, a twelve-week accompaniment was performed. Significant relative reduction for macroscopic and microscopic lesions in lymph nodes of 86,36 % and 80,77 %, respectively, were found for sheep vaccinated with MRV. No macroscopic lesions were found in internal organs. However, a protection of 100 % against microscopic pulmonary lesions was observed in G2. Also, a significant increase in anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels was detected for G2 from on days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment, suggesting a relatively long-lasting humoral immunity. To the best of our knowledge this is the first article to show the vaccine potential of a recombinant subunit vaccine formulation against CLA composed by a mix of antigens in sheep.

So, this article represents one important literature resource that we believe will be highly cited, since its novelty and relevance of the data. This manuscript represents original work that is not being considered for publication, in whole or in part, in another journal, book, conference proceedings, or government publication with a substantial circulation. All previously published work cited in the manuscript has been fully acknowledged. The manuscript is a multi-center clinical trial to which all of the authors have contributed substantially, and they have each approved the final submission.

We are also glad to inform you that our research group has been published in highly cited journals most of the recent papers involving recombinant vaccines against CLA, such as:

- DE PINHO et al. *Mycobacterium bovis* BCG expressing the proteins CP40 or CP09720 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* promotes protection in mice after challenge. VACCINE, v. 42, p. 33-39, 2024.
- BEZERRA et al. Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. VACCINE, v. 39, p. 2568-2574, 2021.
- DE PINHO et al. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, v. 105, p. 2287-2296, 2021.
- SILVA et al. In silico analyses and design of a chimeric protein containing epitopes of SpaC, PknG, NanH, and SodC proteins for the control of caseous lymphadenitis. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, v. 105, p. 8277-8286, 2021.

- BEZERRA et al. The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 149, p. 104354, 2020.
- SILVA, et al. NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. VACCINE, v. 38, p. 8099-8106, 2020.

Finally, I would appreciate very much if you consider the manuscript for publication in Vaccine.

Kind regards,

Francisco Silvestre Brillhante Bezerra

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brillhante Bezerra

Address for correspondence:

Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)

Laboratório de Vacinologia e Imunologia Aplicada (LAVIA)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Av. Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró-RN. CEP: 59.625-900.

Phone: +55 (84) 3317-8200

Email: silvestre@ufersa.edu.br

Declaration of interests

☐The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☒The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Francisco Silvestre Brilhante Bezerra reports financial support was provided by Federal Rural University of the Semi-Arid. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra has patent #BR1020230266568 pending to There is no Licensee yet, the patent was only deposited. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

1 **Highlights**

2

- 3 • MRV increases anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels in sheep
- 4 • MRV protects sheep against microscopic pulmonary lesions
- 5 • MRV protects sheep against microscopic and macroscopic lesions in lymph nodes

Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* challenge in sheep

Abstract

Purpose: In the last decade many antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* have been expressed and used in formulations as an attempt to find a safe and efficient vaccine to be used against CLA. In this study, a Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV) was tested in sheep to evaluate its ability of protection after *C. pseudotuberculosis* challenge and of inducing a humoral response. **Methodology:** For immunization and challenge assays, twelve male lambs (3-4-months-old) were randomly distributed in two groups of six animals each: G1, inoculated with saline solution 0,9% (negative control group); and, G2, inoculated with the Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV), formulated with rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin as adjuvant. Lambs were vaccinated twice with a 21-day interval and were challenged with *C. pseudotuberculosis* four weeks after the last immunization (day 49). Quantification of anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG was performed by indirect ELISA on days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment. Twelve weeks after challenge (day 133) animals were necropsied and the organs were macroscopically and microscopically examined. **Results:** A significant increase in anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels was detected for G2 from day 21 until the end of the experiment (day 133). Significant relative reduction for macroscopic and microscopic lesions in lymph nodes of 86,36 % and 80,77 %, respectively, were found for sheep vaccinated with MRV. No macroscopic lesions were found in internal organs. However, a protection of 100 % against microscopic pulmonary lesions was observed in G2. **Conclusion:** The MRV significantly protects sheep against

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

26 lesions in lymph nodes and lungs and inducing increase in specific IgG levels for at least
27 12 weeks. So, MRV should be considered as a new and promising formulation to be used
28 in sheep for CLA immunoprophylaxis.

29

30 **Keywords:** Caseous lymphadenitis, immunoprophylaxis, small ruminants,
31 phospholipase D, rCP01850, rCP09720.

32

Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* challenge in sheep

Janpson Allan Ribeiro Gurgel ^a, Mônica Ellen da Costa Soares ^a, Thiago Vinicius Santos e Alves, Ana Karolina Melo Oliveira Barros ^a, Lenise Maria Parente Mota ^a, Gabriel Freitas de Macedo ^a, Nicholas Silva dos Santos Filho ^a, Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos ^a, Tallyson Nogueira Barbosa ^b, Jael Soares Batista ^c, Sibele Borsuk ^b, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra ^{a,*}

^a Laboratório de Vacinologia e Imunologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Rua Francisco Mota Bairro, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil.

^b Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, 96160-000, Brazil

^c Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Rua Francisco Mota Bairro, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 84 3317 8267

E-mail adress: silvestre@ufersa.edu.br (F. S. B. Bezerra)

Multiprotein recombinant vaccine induces protection and humoral immune response against *Corynebacterium pseudotuberculosis* challenge in sheep

1. Introduction

Specially in the last decade, an expressive number of papers showing the potential of recombinant vaccines against caseous lymphadenitis (CLA) have been published [1–9]. So, many vaccine formulations have been tested as an attempt to find a safe and efficient product to be used in CLA immunoprophylaxis [10].

Three of those promising *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins are: the phospholipase D (rPLD) [9], the acid phosphatase rCP01850 [4] and the esterase rCP09720 [11]. PLD is one of the most extensive used *C. pseudotuberculosis* antigens in CLA vaccines, being part of many commercial formulations [10]. Also, different combinations using rPLD has been tested, such as rPLD added to saponin [12], recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing rPLD with a booster of rPLD [9], *Escherichia coli* bacterin expressing rPLD [13], in the fusion protein MBP:PLD:CP40, or even in a combination with other recombinant protein (rPLD and rCP40) [8]. Those approaches have been tested in murine models and protection rates have ranged from 30% up to 88% of protection, some of them inducing significant IgG and IFN- γ production.

Different formulations were also tested for the acid phosphatase rCP01850, with the use added by different adjuvants such as: saponin [5], aluminum hydroxide [14], brazilian red propolis hydroalcoholic extract [4], lipid extracts of macroalgae *Sarcopeltis skottsbergii* and *Iridea cordata* [7], with protection rates varying from 0 to 70% of mice after challenge with *C. pseudotuberculosis* and induction of IFN- γ and

IgG. In relation to rCP09720, formulations with saponin [5], aluminum hydroxide [11], and, recently *M. bovis* BCG expressing rCP09720 boosted with rCP09720, this last one inducing high and significant levels of IL-17 and IgG in mice [15].

The combination of different recombinant proteins to formulate CLA vaccines has been tested successfully with synergistic effects. Silva et al. confirmed an improved protection of the association of rCP01850 of rCP09720 with rPLD in comparison to the use of rPLD alone in murine model [12]. Barral et al., showed an increase in IFN- γ and IL-12, and protection of 42.86%, when rPLD and rCP40 were used together for immunize mice [8]. Moreira et al. showed an increase in IgG antibodies with the association of *C. pseudotuberculosis* bacterin (T1 strain) with the proteins rNanH, rSodC and rPLD or rSpaC, rSodC and rPLD in sheep, but no challenge was performed to evaluate protection.

As above mentioned, multiprotein recombinant vaccine (MRV) could provide a bigger repertoire of antigens to elicit a proper and broader range protection in immunized animals. So, this study aimed to evaluate the protective effect of the formulation composed by rPLD, rCP01850 and rCP09720 added to saponin in sheep challenged with a virulent strain of *C. pseudotuberculosis*, and characterize the humoral immune response for 12 weeks after immunization.

2. Material and methods

2.1. *Escherichia coli* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture conditions

E. coli BL21 (DE3) Star grown under stirring in Luria-Bertani medium (LB) or LB-agar 1.5 % at 37 °C for 16 h. Ampicilin 100 μ g/mL was added to the culture

medium when necessary. *C. pseudotuberculosis* strain MIC-6 was cultivated in BHI (Brain Heart Infusion) supplemented with 0.5 % Tween 80 at 37 °C for 72 h in a shaker at 140 rpm, or in BHI Agar 1.5 %.

2.2. Heterologous expression *rPLD*, *rCP01850* and *rCP09720* from *C. pseudotuberculosis*

rPLD, *rCP01850* and *rCP09720* were expressed as previously described by our group [12]. Briefly, the recombinant plasmids *pAE/pld*, *pAE/09720* or *pAE/01850*, previously constructed, were introduced by heat shock into *E. coli* BL21 (DE3) Star. Expression was induced by the addition of 1 mM of isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG) to the culture medium followed by incubation in an orbital shaker at 37 °C for 3 h. For protein purification, the bacteria were pelleted by centrifugation and resuspended in a washing buffer (200 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole; 8 M Urea pH 8.0) with 100 mg/mL lysozyme, sonicated (at 20 KHz) and maintained under agitation at 4 °C for 16 h. Purification was performed by affinity chromatography on a HisTrapTM Sepharose nickel column (GE Healthcare). The purity of the proteins was determined by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), and the concentration was determined using a BCA kit (Pierce). Protein expression was confirmed by western blotting using a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-6X His tag monoclonal antibody (Sigma–Aldrich).

2.3. Experimental animals and ethical aspects

For immunization and challenge assays and assessment of humoral response, twelve male sheep (3-4-months-old), without definite race, were randomly distributed in two groups of six animals each. The animals came from herds without clinical history of CLA, and were submitted previously to and indirect ELISA for searching IgG specific to *C. pseudotuberculosis* according to previously described [16]. Only seronegative sheep were included in the experiment.

Albendazole was used to treat infections caused by worms, and sheep were maintained in quarantine for 30 days before the beginning of the experiments. Sheep were housed in the Teaching and Research Center for Small Ruminants (NEPPER) in the Federal Rural University of Semiarid (UFERSA), fed with hay, concentrate, mineral supplementation and water *ad libitum*. Clinical veterinary monitoring was performed during all that period.

All experiments were performed in compliance with the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The Ethics Commission on Animal's Use (CEUA) of UFERSA approved the project with the number 14/2022. All efforts were made to minimize animals suffering.

2.4. Immunization and challenge assays

For immunization assay, sheep were randomly separated in two groups of six each [17]: G1, inoculated with saline solution 0,9% (negative control group); and, G2, inoculated with the Multiprotein Recombinant Vaccine (MRV), formulated with rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin. MRV was formulated with 100 µg of each recombinant protein plus saponin at 5 mg/dose as adjuvant [18], in a final volume of 1

mL. Immunization schedule consisted by two doses subcutaneously inoculated into the side of the neck with a 21-days interval, at days 0 and 21 of the experiment.

Four weeks (49th experimental day) after the last immunization, in each group, all sheep were challenged by subcutaneous inoculation with 10⁵ CFU/mL (i.p.) of *C. pseudotuberculosis*, MIC-6 virulent strain. Clinical veterinary monitoring was performed until the euthanasia day.

2.5. Assessment of specific IgG levels

Sera samples were collected, on days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment and submitted to indirect ELISA for detection of anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG. Concentrations of each reagent to be used in ELISA protocols were standardized using checkerboard titration method. Polystyrene 96-well plates (Maxisorp-Nunc) were coated with 100 µL of a bicarbonate carbonate buffer (pH 9.6) containing: rPLD 0.5 µg/mL (ELISA anti-rPLD); or rCP01850 2 µg/mL (ELISA anti-rCP01850); or rCP09720 1 µg/mL de (ELISA anti-rCP09720). Plates were incubated for 18 h at 4 °C, and washed 3 times with PBS-T (PBS 1X, pH 7.4, 0.1% tween 20). Blocking was performed with 200 µL/well of 5% skim milk in PBS incubated for 2 hours at 37 °C. A three-step wash was performed, and 100 µL/well of each serum sample from sheep diluted in PBS-T plus skim milk 1% (v/v (1:400 for rPLD, 1:200 for rCP01850 and 1:100 for rCP09720) were added to the plates in duplicate. Plates were incubated for 1 hour at 37 °C. After washing three times with PBS-T, 100 µL/well of anti-sheep IgG conjugated with horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) was added (1:5,000 in PBS-T plus skim milk 1%) in the plates, before revelation step. Plates were incubated by 1 hour at 37°C and then washed five times with PBS-T. After, the reaction

was developed with 100 μ L/well of the substrate-chromogen solution [o-phenylenediamine dihydrochloride; OPD tablets, (Sigma Aldrich) in 0.4 mg/mL phosphate-citrate buffer containing 0.04% of 30% hydrogen peroxide pH=5.0] at room temperature in the dark for 15 minutes, and stopped with 50 μ L/well of H₂SO₄ solution (4N). Optical density (OD) was determined by a microtiter plate reader (Biotek® Micro Plate Reader) at 492 nm.

2.6. Necropsy and histopathological evaluation

Twelve weeks after challenge, sheep were euthanized with xylazine and propofol, necropsied in the Veterinary Pathology Laboratory of UFERSA, and submitted to a complete anatomopathological examination. Internal organs susceptible to be affected by CLA (lungs, liver, kidneys and spleen), superficial and internal lymph nodes were examined for granulomas and macroscopical aspects (size, color, texture) and samples of each organ were collected for bacteriological tests and histopathological analysis. Tissues were fixed in modified Davidson's fixative fluid (mDF), then taken for histological processing, paraffin embedded, sectioned (thickness of 5 μ m), and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Microscopically, the samples were analyzed for the presence of bacteria, necrosis and/or inflammatory infiltrates. Sections were then blindly examined by a trained pathologist.

2.7. Establishment of MRV protection rate

Aiming to calculate the protection rate of MRV, we used a protocol previously published with some modifications [19]. Scores were adopted based on the lesion type

and intensity for each organ (mesenteric, right and left pre-scapular, right and left parotid, and right and left popliteal lymph nodes and lungs). The macroscopic lesions characterization in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: Score 0 normal aspect; Score 1, enlarged lymph node; Score 2, enlarged and hemorrhagic or congested lymph node; Score 3, enlarged with focal necrosis, abscesses or caseation. In relation to the lymph nodes microscopic lesions, we scored the 0-3 scale as follows: Score 0, normal aspect; Score 1, presence of follicular lymphoid hyperplasia; Score 2, presence of hemorrhagic or congested areas; Score 3, capsulated abscesses with necrotic cells and inflammatory infiltrate. The microscopic lesions in lungs were scored on a 0-2 scale, being: Score 0, normal aspect; Score 1, presence of moderate interstitial pneumonia; Score 2, presence of moderate interstitial pneumonia and congestion.

Therefore, the possible maximum scores for macroscopic and histopathological lesions of lymph nodes could be: 1. maximum score for each lymph node = 03; 2. maximum score for each sheep = $7 \times 3 = 21$; 3. maximum score for each group = $6 \times 21 = 126$. On the other hand, the possible maximum scores for histopathological lesions of lungs could be: 1. maximum score for each lymph node = 02; 2. maximum score for each animal = $7 \times 2 = 14$; 3. maximum score for each group = $6 \times 14 = 84$.

To calculate the index of relative reduced lesions, the sum of the scores obtained for control group was adopted as the maximum number of lesions, and the relative proportion of lesions for the MRV group was made.

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (S.D.) and analyzed using GraphPad Prism, version 8.0, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests were applied to assess normality for humoral response and lesions scores data, respectively. Mann-Whitney test was used to compare the means of non-parametric data related to histopathological and macroscopic lesions scores. To specific IgG levels analysis, the approach used was the "Multiple t test per Row" with statistical significance determination by the Holm-Sidak method, The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Expression of rPLD, rCP01850 and rCP09720

The expression of the recombinant proteins was confirmed by Western blotting with a monoclonal anti-6X-His antibody, and the clear bands with molecular weights of 31 (rPLD), 33.5 (rCP01850), and 35 kDa (rCP09720) indicated the successful expression of the proteins. The proteins were expression in inclusion bodies of *E. coli*, and were solubilized in 8M urea. The yields obtained after purification and re-folding were 3.669 mg/L, 5.376 mg/L, and 2.217 mg/L for rPLD, rCP01850, and rCP09720, respectively.

3.2. Specific anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels

Fig. 1 shows the results obtained from the indirect ELISA to measure anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels for both control and MRV groups at days 0, 21, 49, 77, 105 and 133 of the experiment. Significant increase in the anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels was observed starting from the 21st

experimental day, denoting the effect of the first MRV dose on the humoral immune response. The significant highest values of anti-rPLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels remained until the end of the experiment, representing a sustained humoral immune response induced by MRV. In spite of the significant difference, apparently there is a downward trend in anti-rCP09720 IgG levels, while there is a tendency for anti-rPLD and anti-rCP01850 IgG levels to be maintained for a longer period of time.

3.3. Description of CLA lesions and establishment of protection in sheep

Challenge with MIC-6 strain *C. pseudotuberculosis* only produced lesions in lymph nodes and lungs. Scored macroscopic and microscopic lesions found in lymph nodes in each lamb were summarized in Table 1 and Table 2, respectively. Macroscopic lesions were significantly higher for lymph nodes of G1, resulting in a significant relative reduction lesions index of 86,36 % in vaccinated group. Microscopic lesions were also significantly higher for lymph nodes of G1, resulting in a significant relative reduction lesions index of 80,77 % in vaccinated group. Statistical difference was found in prescapular and parotid lymph nodes for both macroscopic and microscopic lesions (Fig. 2 and Fig. 3). Lesion in lungs only could be noticed microscopically, as seen in Table 3. In the control group (G1), two lambs presented moderate interstitial pneumonia, two lambs presented moderate interstitial pneumonia and congestion, and two lambs presented normal aspect. On the other hand, none of the lambs in G2 presented lesions, which resulted in a significant relative reduction lesions index of 100% in vaccinated lambs.

4. Discussion

To the best of our knowledge this is the first study to assess a vaccinal formulation against CLA composed of a combination of recombinant proteins of *C. pseudotuberculosis* (MRV), specifically rPLD, rCP01850 and rCP09720, associated with saponin in sheep. Recently, Moreira et al. showed the benefit of adding the combination of proteins rSpaC, rSodC and rPLD or rNanH, rSodC and rPLD to the T1 strain of *C. pseudotuberculosis* bacterin to immunize sheep, especially in relation to IgG and IFN- γ production [20]. However, these authors faced some bottlenecks in our point of view. They did not use a negative control group, used only 3 lambs in each group, and the absence of histopathological analysis that could indicate unnoticed injuries when just gross examination is performed. In our study, microscopical analysis was able to reveal protective immunity of our subunit recombinant vaccine, especially in lungs.

In this sense, lambs vaccinated with MRV showed a 100% of relative reduction lesions index in microscopical lungs analysis (Table 3), in spite of no macroscopical lesions were observed in internal organs analyzed here in G1 and G2 (lungs, liver, kidneys and spleen). Our data are in accordance to a previous study that showed in experimental infection of lambs with *C. pseudotuberculosis* the development of lesions only in lungs and lymph nodes [21]. In fact, even in naturally infected sheep affected by visceral form of CLA, lesions in respiratory system are more often [22].

The ability of a subunit vaccine in reducing pulmonary lesions was also previously demonstrated. The vaccination of sheep with two 100 μ g doses of a 40-kDa antigen preparation in aluminum hydroxide adjuvant was able to induces 98 % reduction in lung lesions [23], reinforcing this promising vaccinal platform against CLA. Protection against pulmonary lesions in sheep was also reported with the use of

rPLD [24]. It is important to highlight that when *C. pseudotuberculosis* is present in the lungs, the organism may be transmitted through respiratory secretions (nasal discharge or coughing) and may display clinical signs of respiratory disease such as dyspnea, tachypnea, and chronic cough, in addition to chronic weight loss [25]. So, preventing pulmonary lesions could help to reduce CLA levels in the herd by airway.

Expressive reduction in lymph nodes lesions both microscopically and macroscopically were also observed in lambs vaccinated with MRV (G2). Those data are remarkable, once preventing the abscess formation is the main objective of CLA immunoprophylaxis. Recombinant subunit vaccines are recognized by their safety, which has a big impact, once one of the main adverse effects of CLA commercial vaccines is abscess at the injection site and reduced productivity of small ruminants. So, many efforts have been made to find vaccinal candidates to formulate a safe and efficient CLA vaccinal formulation [10]. And to increase the immunogenicity of purified proteins, saponins have been pointed as an ideal adjuvant for subunit vaccines against intracellular pathogens, especially for stimulating a Th1 response and induce cytotoxic lymphocytes [26]. In fact, many studies with recombinant subunit vaccines against CLA have been using saponin as adjuvant [5,6,12,27].

Here, we chose the combination of three extensively studied recombinant antigens of *C. pseudotuberculosis* (rPLD, rCP01850 and rCP09720) associated to saponin to formulate a vaccine. However, only rPLD was tested in sheep, probably for being considered the main virulence factor, essential to the spread of *C. pseudotuberculosis* [28]. Fontaine et al. reported for the first time in 2006 statistically significant protection in sheep immunized with an heterologous expressed rPLD, showing reduction in the lesions of lymph nodes and lungs [24], corroborating to our results. The combination of genetically mutated rPLD and formalin bacterin with oil

adjuvant provided full protection (100%) against lesions in lymph nodes of sheep challenged with *C. pseudotuberculosis* [29].

The recombinant esterase rCP09720 was tested for the first time in 2017, more than ten years after rPLD only in mice. Brum et al. immunized mice with rCP09720 associated with aluminum and obtained significant protection rate of 58.3 % after challenge with *C. pseudotuberculosis*, and significant levels of IgG1 and IgG2a and IFN- γ ($P < 0.05$), suggesting a Th1 response [3]. One year later, in 2018, Silva et al. used the acid phosphatase rCP01850 for the first time for vaccinal purposes, and showed the incremental benefit of adding more than one recombinant protein in vaccines against CLA. The authors demonstrated that association of rPLD with rCP01850 promoted higher and significant protection against *C. pseudotuberculosis* challenge, and also IgG and IFN- γ levels in comparison to the use of rPLD alone in mice [12].

In our study, MRV composed by rPLD, rCP01850 and rCP09720 and saponin reduced lesions in lymph nodes, lungs and also induced a significant humoral IgG immune response in sheep. A significant increase in the specific anti-PLD, anti-rCP01850 and anti-rCP09720 IgG levels were observed in lambs vaccinated with MRV, and were sustained higher by approximately 12 weeks, suggesting a relatively long-lasting humoral immunity. Studies using specific anti-PLD antibodies were able to prevent *C. pseudotuberculosis* spread, showing the importance of this antibody [28]. It is known that both humoral and cellular immunity, with a Th1-like immunophenotype, are required for protection against CLA. While IgG antibodies help to protect animals against infection, neutralizing, opsonizing and activating complement system, activation of CD8⁺ cells and the secretion of IFN- γ could control infected cells and spread of bacteria in early phase of the infection process [28]. So, evaluating the cellular immune

response triggered by MRV is the next step to better characterize immune response induced by this vaccinal formulation.

Especially in the last decade, a variety of new *C. pseudotuberculosis* recombinant proteins started to be expressed for vaccine purposes in mice [10]. But the lack of testing on target species meant that few new products reached the market. Thus, our results bring new possibilities and advances to the field of vaccinology applied to CLA, in the search of vaccines more efficient and safer.

5. Conclusion

Multiprotein recombinant vaccine formulated with rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin, significantly protects lambs against *C. pseudotuberculosis* challenge, reducing lesions in lymph nodes and lungs and inducing a sustainable IgG production for at least 12 weeks after vaccination. So, MRV should be considered a promising vaccinal formulation to be used against CLA in sheep.

Competing interests

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: patent application for the multiprotein recombinant vaccine formulated with rPLD, rCP01850, rCP09720 and saponin to be used against CLA in the National Institute of Industrial Property (INPI, Brazil) under the number BR 10 2023 026656 8.

Funding sources

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grant number 421271/2018-3]. The work was also financially supported by Federal Rural University of Semiarid (UFERSA).

References

- [1] Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW, Miyoshi A, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res* 2014;10:965. doi:10.1186/s12917-014-0304-6.
- [2] Droppa-Almeida D, Vivas WLP, Kelly K, Silva O, Rezende AFS, Simionatto S, et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine* 2016;34:1091–6. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.064.
- [3] Brum AA, Rezende A de FS, Brilhante FS, Collares T, Begnine K, Seixas FK, et al. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microbiol* 2017;66:635–42. doi:10.1099/jmm.0.000477.
- [4] Brilhante Bezerra FS, Silva Rezende A de F, Oliveira Silva MT de, Sena-Lopes Â, Roesch-Ely M, Pêgas Henriques JA, et al. The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microb Pathog* 2020;149. doi:10.1016/j.micpath.2020.104354.
- [5] Bezerra FSB, Silva MT de O, Rezende A de FS, Lopes AS, Pinho RB de, Seixas FK, et al. Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660,

rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine* 2021;39:2568–74.

[6] Scholl NR, Silva MT de O, Barbosa TN, de Pinho RB, Alves MSD, Portela RW, et al. Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. *Vaccines* 2023;11:519.

doi:10.3390/VACCINES11030519.

[7] Barbosa TN, Silva MT de O, Pinho RB de, Scholl NR, Pereira CMP de, Mansilla A, et al. Characterization of the adjuvant activity of lipid extracts of *Sarcopeltis skottsbergii* and *Iridea cordata* associated with recombinant protein rCP01850 as an immunogen against caseous lymphadenitis. *Biotechnol Res Innov J* 2023;7:0–0. doi:10.4322/BIORI.00182023.

[8] Doria Barral T, Alcantara Kalil M, Barros Mariutti R, Krishnaswamy Arni R, Gismene C, Severo Sousa F, et al. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2022;1:8035–51. doi:10.1007/s00253-022-12279-1.

[9] Leal KS, de Oliveira Silva MT, de Fátima Silva Rezende A, Bezerra FSB, Begnini K, Seixas F, et al. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine* 2018;36:3578–83. doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.049.

[10] Pinho RB de, Silva MT de O, Bezerra FSB, Borsuk S. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021;105:2287–2296.

[11] Brum AA, Rezende AFS, Brilhante FS, Collares T, Begnini K, Seixas FK, et al. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and

- 373 Subunit recombinant vaccines partially protect mice against challenge. *J Med*
 374 *Microbiol* 2017;66:635–42.
- 375 [12] Silva MT de O, Bezerra FSB, de Pinho RB, Begnini KR, Seixas FK, Collares T,
 376 et al. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins
 377 rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis
 378 immunoprophylaxis. *Vaccine* 2018;36:74–83.
 379 doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.029.
- 380 [13] Barros de Pinho R, de Oliveira Silva MT, Brenner G, Dié Alves MS, Azevedo V,
 381 Dias Portela R, et al. A novel approach for an immunogen against
 382 *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection: An *Escherichia coli* bacterin
 383 expressing phospholipase D. *Microb Pathog* 2021;151.
 384 doi:10.1016/j.micpath.2021.104746.
- 385 [14] Rezende A de FS, BRUM AA, Bezerra FSB, Braite DC, Sá GL, Thurow HS, et
 386 al. Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium*
 387 *pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous
 388 lymphadenitis. *Brazilian J Vet Anim Sci* 2020;72:199–207.
- 389 [15] de Pinho RB, Barbosa TN, Dall’Agno L, da Rocha Fonseca B, Bezerra FSB,
 390 Sousa FSS, et al. *Mycobacterium bovis* BCG expressing the proteins CP40 or
 391 CP09720 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* promotes protection in mice
 392 after challenge. *Vaccine* 2024;42:33–9. doi:10.1016/J.VACCINE.2023.11.049.
- 393 [16] Alves JRA, de Farias AEM, dos Anjos DM, Lima AMC, Faccioli-Martins PY, de
 394 Souza CJH, et al. Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep
 395 from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. *Trop Anim Health*
 396 *Prod* 2020;52:1945–52. doi:10.1007/s11250-020-02214-9.
- 397 [17] Almazán C, Šimo L, Fourniol L, Rakotobe S, Borneres J, Cote M, et al. Multiple

antigenic peptide-based vaccines targeting ixodes ricinus neuropeptides induce a specific antibody response but do not impact tick infestation. *Pathogens* 2020;9:1–16. doi:10.3390/pathogens9110900.

[18] Harrison GBL, Shakes TR, Robinson CM, Lawrence SB, Heath DD, Dempster RP, et al. Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulated with saponin or selected adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;70:161–72. doi:10.1016/S0165-2427(99)00039-2.

[19] Selim S a, Ghoneim ME, Mohamed k HF. Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. *Int J Microbiol Res* 2010;1:129–36.

[20] Moreira LS, Lopes N da R, Pereira VC, Andrade CLB, Torres AJL, Ribeiro MB, et al. The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. *Vaccines* 2022;10. doi:10.3390/VACCINES10091406.

[21] Brogden KA, Cutlip RC, Lehmkuhl HD. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am J Vet Res* 1984;45:1532–4.

[22] Ruiz H, Ferrer LM, Ramos JJ, Baselga C, Alzuguren O, Tejedor MT, et al. The relevance of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. *Animals* 2020;10:1–13. doi:10.3390/ani10111962.

[23] 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.

[24] Fontaine MC, Baird G, Connor KM, 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;24:5986–

- 423 96. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.005.
- 424 [25] Pugh DG, Baird AN. Sheep and Goat Medicine. 2nd ed. Philadelphia: W.B.
- 425 Saunders Company; 2012.
- 426 [26] Sun H-X, Xie Y, Ye Y-P. Advances in saponin-based adjuvants. Vaccine
- 427 2009;27:1787–96. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.091.
- 428 [27] Bastos BL, Loureiro D, Raynal JT, Guedes MT, Vale VLC, Moura-Costa LF, et
- 429 al. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression
- 430 of caseous lymphadenitis in sheep. BMC Vet Res 2013;9:254. doi:10.1186/1746-
- 431 6148-9-254.
- 432 [28] Bastos BL, Portela RWD, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N, Castro TL de P, et
- 433 al. Corynebacterium pseudotuberculosis: immunological responses in animal
- 434 models and zoonotic potential. J Clin Cell Immunol 2012;01:1–15.
- 435 doi:10.4172/2155-9899.S4-005.
- 436 [29] SA S, ME G, KF M. Vacinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D
- 437 against caseous lymphadenitis in small ruminants. Int J Microbiol Res 2010.
- 438
- 439

Gurgel et al., 2024

Figure legends

Figure 1. Specific anti-PLD (1A), anti-rCP01850 (1B) and anti-rCP09720 (1C) IgG levels induced by sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine

formulated with rPLD, rCP01850 and rCP09720 from *Corynebacterium*

***pseudotuberculosis* and saponin against caseous lymphadenitis. Dose 1 was**

inoculated in day 0, Dose 2 was inoculated in day 21 and challenge with *C.*

***pseudotuberculosis* was performed in day 49 of the experiment. Results are presented as**

the means and standard deviation (bars) for each experiment with six animals per group.

Significant differences ($p < 0.05$) between IgG production in different groups was

calculated employing Multiple t test – one per row and Holm-Sidak post-test. The

asterisk (*) on the same day represents statistical difference ($P < 0.05$).

Figure 2. Comparison between scores applied to macroscopic lesions found in

different lymph nodes during anatomopathological examination of sheep

immunized with a recombinant multiprotein vaccine (G2) in comparison to

negative control group (G1). Data from different lymph nodes are sub represented as

follows: pre-scapular (A), parotid (B), popliteal (C) and mesenteric (D). Necropsy was

performed 12 weeks after challenge with *C. pseudotuberculosis* virulent strain (day 133

of the experiment). The macroscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale,

being: score 0, normal aspect; score 1, enlarged lymph node, score 2, enlarged and

hemorrhagic or congested lymph node; score 3, enlarged lymph node with focal

necrosis, abscesses or caseation. Results are presented as mean $\pm$ standard errors (bars)

and were statistically evaluated using Mann-Whitney test for comparison of means.

Different letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between

experimental groups.

Figure 3. Comparison between scores applied to microscopic lesions found in different lymph nodes during histopathological examination of sheep immunized with a recombinant multiprotein vaccine (G2) in comparison to negative control group (G1). Data from different lymph nodes are sub represented as follows: pre-scapular (A), parotid (B), popliteal (C) and mesenteric (D). Necropsy was performed 12 weeks after challenge with *C. pseudotuberculosis* virulent strain (day 133 of the experiment). The microscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: score 0, normal aspect; score 1, presence of follicular lymphoid hyperplasia; score 2, presence of hemorrhagic or congested areas; score 3, capsulated abscess, necrotic cells and inflammatory infiltrate. Results are presented as mean $\pm$ standard errors (bars) and were statistically evaluated using Mann-Whitney test for comparison of means. Different letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between the experimental groups.

482 **Gurgel et al., 2024**

483

484 **Table 1. Scores attributed to macroscopic lesions found in lymph nodes of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine**
 485 **(MRV, G2), in comparison to control group (G1).** The macroscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: score 0, normal
 486 aspect; score 1, enlarged lymph node, score 2, enlarged and hemorrhagic or congested lymph node; score 3, enlarged lymph node with focal
 487 necrosis, abscesses or caseation. Asterisk (*) represents significant difference ($p < 0.05$) between groups. RPS = right prescapular; LPS = left
 488 prescapular; RPA = right parotid; LPA = left parotid; RPO = right popliteal; LPO = left popliteal.

489

Lymph nodes macroscopic lesions scores									Total Scores	Index of	Relative
Groups	Animal	Prescapular*		Parotid*		Popliteal		Mesenteric	of each group*	Lesions induced*	Reduction Lesions Index
		RPS	LPS	RPA	LPA	RPO	LPO				
G1 (saline solution 0,9%)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	+ (1/3)	36/126	0,286	86,36 %
	A2	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A8	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)		
G2 (MRV)	A9	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	5/126	0,039
	A10	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)		
	A11	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		

490

491 **Table 2. Scores attributed to microscopic lesions found in lymph nodes of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine**

492 **(MRV, G2), in comparison to control group (G1).** The microscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: score 0, normal

493 aspect; score 1, presence of follicular lymphoid hyperplasia; score 2, presence of hemorrhagic or congested areas; score 3, capsulated abscess,

494 necrotic cells and inflammatory infiltrate. Asterisk (*) represents significant difference ($p < 0.05$) between groups. RPS = right prescapular; LPS

495 = left prescapular; RPA = right parotid; LPA = left parotid; RPO = right popliteal; LPO = left popliteal.

496

Lymph nodes microscopic lesions scores	Total Scores	Index of	Relative
--	--------------	----------	----------

Groups	Animal	Prescapular*		Parotid*		Popliteal		Mesenteric	of each group*	Lesions induced*	Reduction Lesions Index
		RPS	LPS	RPA	LPA	RPO	LPO				
G1 (saline solution 0,9%)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	36/126	0,286	80,77 %
	A2	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A4	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (MRV)	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	7/126	0,055	
	A8	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A9	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A10	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A11	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

497

498 **Table 3. Scores attributed to microscopic lesions found in lungs of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine (MRV, G2),**

499 **in comparison to control group (G1).** The microscopic lesions in lungs were scored on a 0-2 scale, being: Score 0, normal aspect; Score 1,

500 presence of moderate interstitial pneumonia; Score 2, presence of moderate interstitial pneumonia and congestion. Asterisk (*) represents
 501 significant difference ($p < 0.05$) between groups.

502

Lungs microscopic lesions scores				Total Scores of each group*	Index of Lesions induced*	Relative Reduction Lesions Index
Groups	Animal	Lungs				
		Right	Left			
G1 (saline solution 0,9%)	A1	+ (1/2)	+ (1/2)	12/24	0,5	100 %
	A2	+ (1/2)	+ (1/2)			
	A3	++ (2/2)	++ (2/2)			
	A4	++ (2/2)	++ (2/2)			
	A5	- (0/2)	- (0/2)			
	A6	- (0/2)	- (0/2)			
G2 (MRV)	A7	- (0/2)	- (0/2)	0/24	0	
	A8	- (0/2)	- (0/2)			
	A9	- (0/2)	- (0/2)			
	A10	- (0/2)	- (0/2)			
	A11	- (0/2)	- (0/2)			

A12

- (0/2)

- (0/2)

1 **Gurgel et al., 2024**

2

3 **Table 1. Scores attributed to macroscopic lesions found in lymph nodes of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine**
4 **(MRV, G2), in comparison to control group (G1).** The macroscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: score 0, normal
5 aspect; score 1, enlarged lymph node, score 2, enlarged and hemorrhagic or congested lymph node; score 3, enlarged lymph node with focal
6 necrosis, abscesses or caseation. Asterisk (*) represents significant difference ($p < 0.05$) between groups. RPS = right prescapular; LPS = left
7 prescapular; RPA = right parotid; LPA = left parotid; RPO = right popliteal; LPO = left popliteal.

8

Lymph nodes macroscopic lesions scores									Total Scores	Index of	Relative
Groups	Animal	Prescapular*		Parotid*		Popliteal		Mesenteric	of each group*	Lesions induced*	Reduction Lesions Index
		RPS	LPS	RPA	LPA	RPO	LPO				
G1 (saline solution 0,9%)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	+ (1/3)	36/126	0,286	86,36 %
	A2	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A8	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)		
G2 (MRV)	A9	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	5/126	0,039
	A10	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)		
	A11	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)		

9

10 **Table 2. Scores attributed to microscopic lesions found in lymph nodes of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine**
11 **(MRV, G2), in comparison to control group (G1).** The microscopic lesions in lymph nodes were scored on a 0-3 scale, being: score 0, normal
12 aspect; score 1, presence of follicular lymphoid hyperplasia; score 2, presence of hemorrhagic or congested areas; score 3, capsulated abscess,
13 necrotic cells and inflammatory infiltrate. Asterisk (*) represents significant difference ($p < 0.05$) between groups. RPS = right prescapular; LPS
14 = left prescapular; RPA = right parotid; LPA = left parotid; RPO = right popliteal; LPO = left popliteal.

15

Lymph nodes microscopic lesions scores	Total Scores	Index of	Relative
--	--------------	----------	----------

Groups	Animal	Prescapular*		Parotid*		Popliteal		Mesenteric	of each group*	Lesions induced*	Reduction Lesions Index
		RPS	LPS	RPA	LPA	RPO	LPO				
G1 (saline solution 0,9%)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	36/126	0,286	80,77 %
	A2	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A4	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (MRV)	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	7/126	0,055	
	A8	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A9	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A10	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A11	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

16

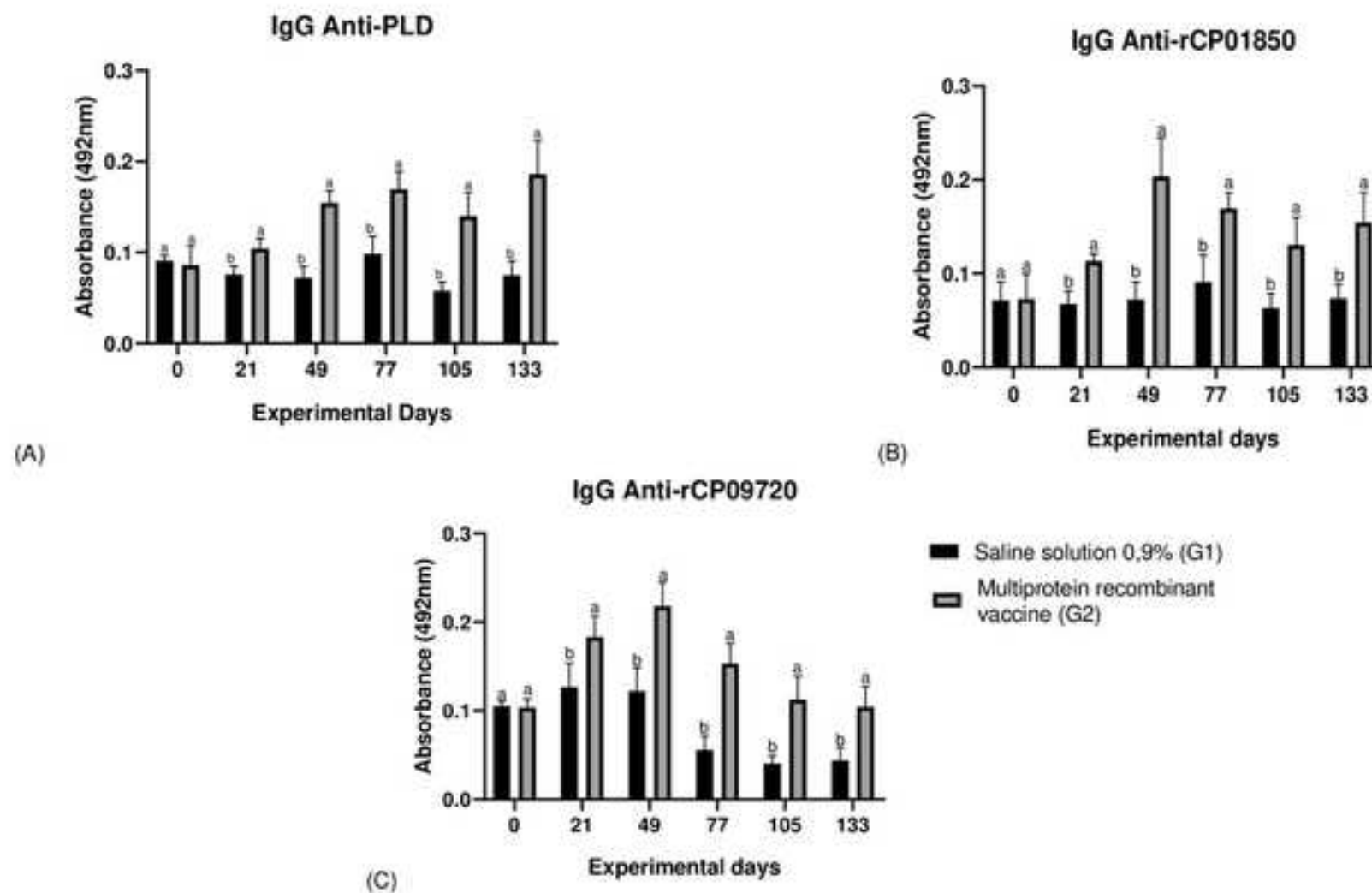
17 **Table 3. Scores attributed to microscopic lesions found in lungs of sheep inoculated with a multiprotein recombinant vaccine (MRV, G2),**
18 **in comparison to control group (G1).** The microscopic lesions in lungs were scored on a 0-2 scale, being: Score 0, normal aspect; Score 1,

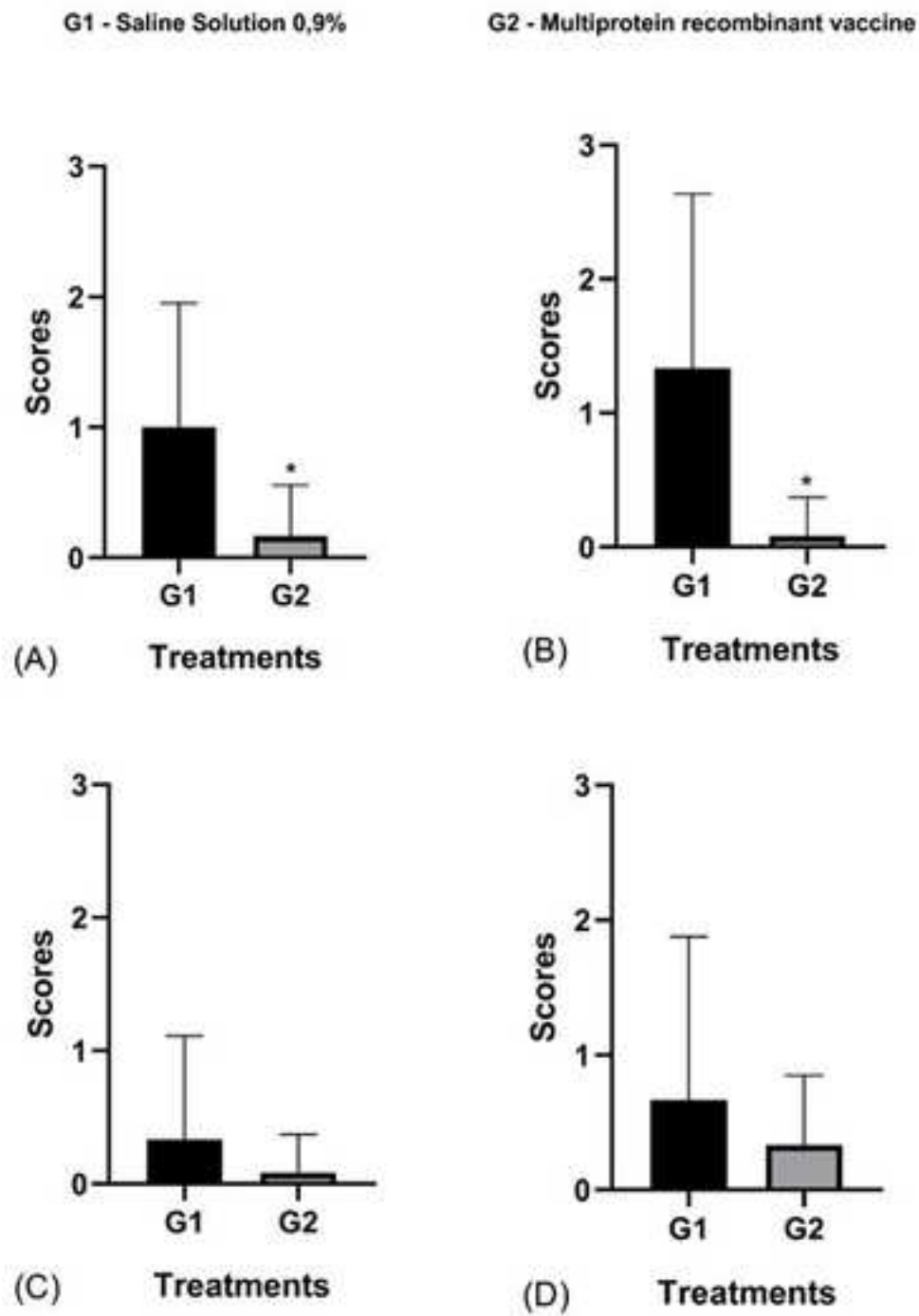
19 presence of moderate interstitial pneumonia; Score 2, presence of moderate interstitial pneumonia and congestion. Asterisk (*) represents
 20 significant difference ($p < 0.05$) between groups.

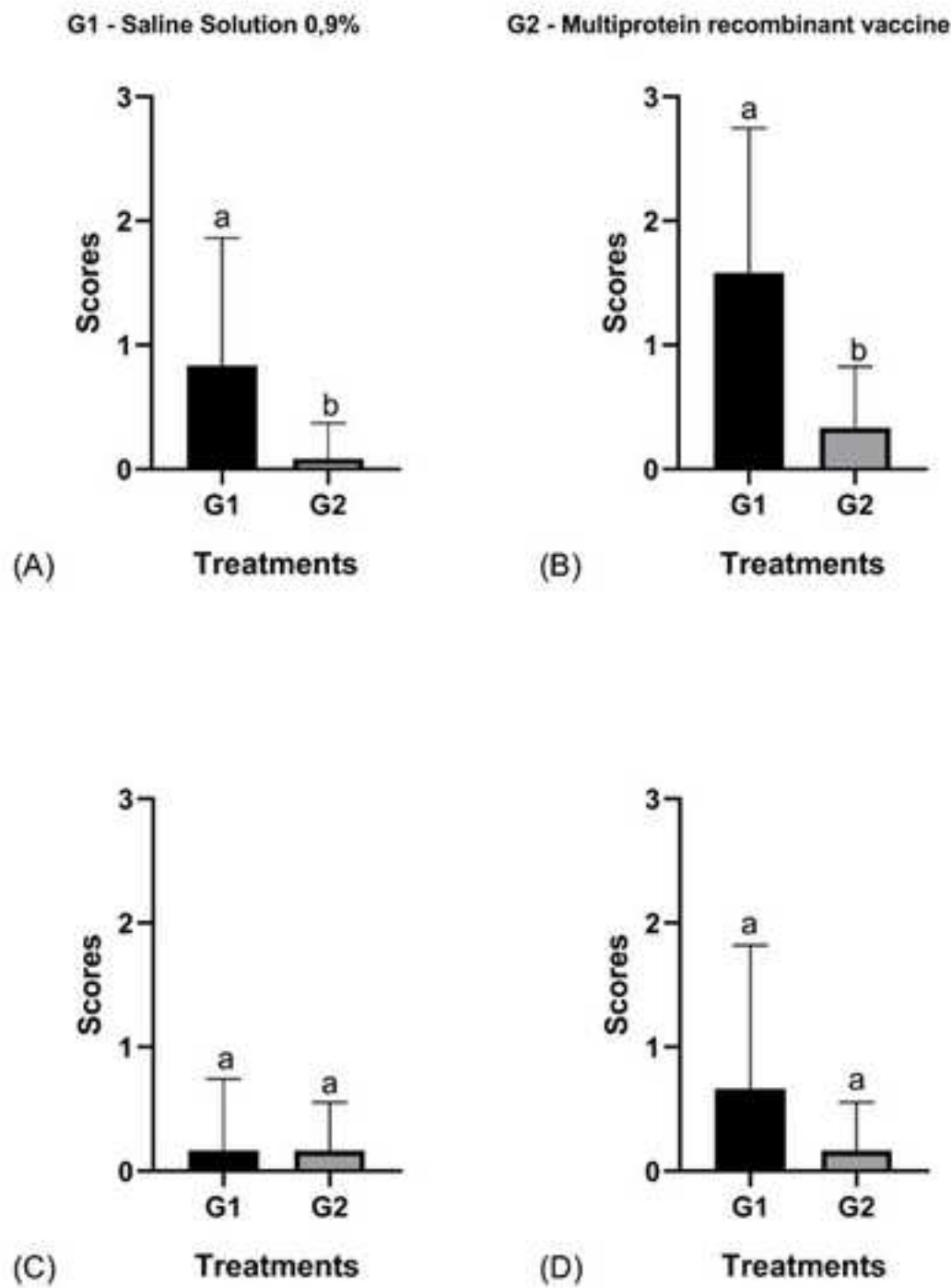
21

Lungs microscopic lesions scores				Total Scores of each group*	Index of Lesions induced*	Relative Reduction Lesions Index
Groups	Animal	Lungs				
		Right	Left			
G1 (saline solution 0,9%)	A1	+ (1/2)	+ (1/2)	12/24	0,5	100 %
	A2	+ (1/2)	+ (1/2)			
	A3	++ (2/2)	++ (2/2)			
	A4	++ (2/2)	++ (2/2)			
	A5	- (0/2)	- (0/2)			
	A6	- (0/2)	- (0/2)			
G2 (MRV)	A7	- (0/2)	- (0/2)	0/24	0	
	A8	- (0/2)	- (0/2)			
	A9	- (0/2)	- (0/2)			
	A10	- (0/2)	- (0/2)			
	A11	- (0/2)	- (0/2)			

A12	- (0/2)	- (0/2)
-----	---------	---------









Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 026656 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ARIDO - UFERSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24529265000140

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva

Cidade: Mossoro

Estado: RN

CEP: 59625-900

País: Brasil

Telefone: (84)3317 8312

Fax:

Email: nit@ufersa.edu.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA IMUNOPROFILAXIA DA LINFADENITE CASEOSA

Resumo: A presente invenção refere-se à utilização da associação das proteínas recombinantes antigênicas rCP01850, rCP09720 e rPLD sintetizadas a partir de genes de *C. pseudotuberculosis*, em vacinas recombinantes de subunidade para linfadenite caseosa. Tal invenção objetiva sanar a problemática vinculada às reações adversas locais e sistêmicas presentes em vacinas comerciais disponíveis. Até o momento, essa é primeira formulação vacinal contra a linfadenite caseosa, contendo essa associação destas três proteínas recombinantes em uma mesma formulação acrescida do adjuvante saponina, que foi testada em ovinos. Os resultados obtidos demonstraram o aumento da produção de anticorpos IgG anti-proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD de forma sustentada por até 3 meses após a realização do esquema vacinal completo de 2 doses intervaladas por 21 dias. A formulação foi capaz de induzir uma taxa de redução de lesões significativa de 86,11% nos linfonodos à análise macroscópica, corroborando o potencial imunoprolático da formulação.

Figura a publicar: 01

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 14

Nome: FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

CPF: 05093063495

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Amélia Resende, no 120, Bairro Vingt Rosado

Cidade: Mossoro

Estado: RN

CEP: 59626-500

País: BRASIL

Telefone: (84) 998 079504

Fax:

Email: silvestre@ufersa.edu.br

Inventor 2 de 14

Nome: JANPSON ALLAN RIBEIRO GURGEL

CPF: 00986700428

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Brigadeiro Salema, no 1320, Bairro Alto de São Manoel

Cidade: MOSSORÓ

Estado: RN

CEP: 59628-030

País: BRASIL

Telefone: (84) 996 053090

Fax:

Email: jampson@gmail.com

Inventor 3 de 14

Nome: MÔNICA ELLEN DA COSTA SOARES

CPF: 01834097444

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Rua Otacílio Silva, no 08, Bairro Rincão

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59626-220

País: BRASIL

Telefone: (84) 986 520447

Fax:

Email: monicaellencs@gmail.com

Inventor 4 de 14

Nome: THIAGO VINICIUS SANTOS E ALVES

CPF: 11634084411

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Rua Zeca Cirilino, no 647, Bairro Barrocas

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59621-470

País: BRASIL

Telefone: (84) 996 962162

Fax:

Email: thiago.vsa12@gmail.com

Inventor 5 de 14

Nome: LENISE MARIA PARENTE MOTA

CPF: 05955073361

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua João Bosco Leite da Frota, no 24, Bairro Presidente Costa e Silva

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59625-601

País: BRASIL

Telefone: (88) 997 050346

Fax:

Email: lenisemota76@gmail.com

Inventor 6 de 14

Nome: GABRIEL FREITAS DE MACEDO

CPF: 09253496401

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Av. Francisco Mota, no 2998, Bairro Pres. Costa e Silva

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59625-395

País: BRASIL

Telefone: (84) 988 713367

Fax:

Email: gabrielfdemacedo@gmail.com

Inventor 7 de 14

Nome: ANA KAROLINA MELO OLIVEIRA BARROS

CPF: 02860950176

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Av. Brigadeiro Salema, no 714, Bairro Presidente Costa e Silva

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59628-396

País: BRASIL

Telefone: (88) 996 634151

Fax:

Email: karol_mob@hotmail.com

Inventor 8 de 14

Nome: NICHOLAS SILVA DOS SANTOS FILHO

CPF: 61042527377

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua 43, Casa 1192, Bairro Vila velha

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60348-570

País: BRASIL

Telefone: (85) 986 611780

Fax:

Email: nicholassantos@alu.ufc.br

Inventor 9 de 14

Nome: BÁRBARA MONIQUE DE FREITAS VASCONCELOS

CPF: 07789124420

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Venceslau-Braz, no 806, Bairro Paredões

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59618-140

País: BRASIL

Telefone: (84) 996 212510

Fax:

Email: barbara.biotec1@gmail.com

Inventor 10 de 14

Nome: TALLYSON NOGUEIRA BARBOSA

CPF: 05313131311

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Rua Limerio Osterne, no 1662, Sítio Socorro

Cidade: Limoeiro do Norte

Estado: CE

CEP: 62930-000

País: BRASIL

Telefone: (88) 999 041134

Fax:

Email: tallyson1792@gmail.com

Inventor 11 de 14

Nome: CIBELE DOS SANTOS BORGES

CPF: 01580378633

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua Beatriz Maria da Costa, no 900, Bairro: Alto do Sumaré

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59634-170

País: BRASIL

Telefone: (84) 994 981665

Fax:

Email: cibele.borges@ufersa.edu.br

Inventor 12 de 14

Nome: JAELE SOARES BATISTA

CPF: 68493193372

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Sabino Maciel Junior, no 85, Bairro Dom Jaime Câmara

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59628-782

País: BRASIL

Telefone: (84) 999 345272

Fax:

Email: jael.batista@ufersa.edu.br

Inventor 13 de 14

Nome: MARCELO BARBOSA BEZERRA

CPF: 48426628320

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Sebastião Cândido de França, no 321, Bairro Alto do Sumaré

Cidade: Mossoró

Estado: RN

CEP: 59633-835

País: BRASIL

Telefone: (84) 988 069660

Fax:

Email: mbezerra@ufersa.edu.br

Inventor 14 de 14

Nome: SIBELE BORSUK

CPF: 95168192068

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Padre Anchieta, no 5463, Casa 9, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-420

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 416888

Fax:

Email: sibeleborsuk@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento - Pedido de invenção - Silvestre.pdf
Desenho	Desenhos - Silvestre.pdf
Reivindicação	Reivindicações - Silvestre.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo - patente_vacina_multiproteína - OK - Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.pdf
Resumo	Resumo - patente_vacina_multiproteína - Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.pdf

Sequências Biológicas

- ☒ Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato XML	Listagem de Sequências - Vacina Multiproteína - Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.xml

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FIGURA 1

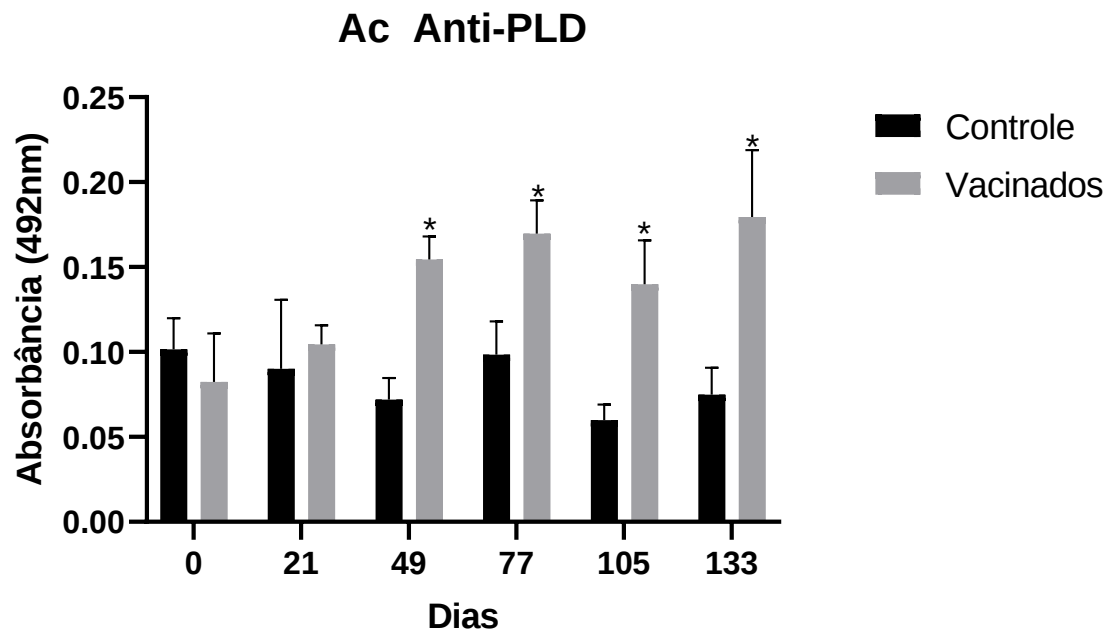


FIGURA 2

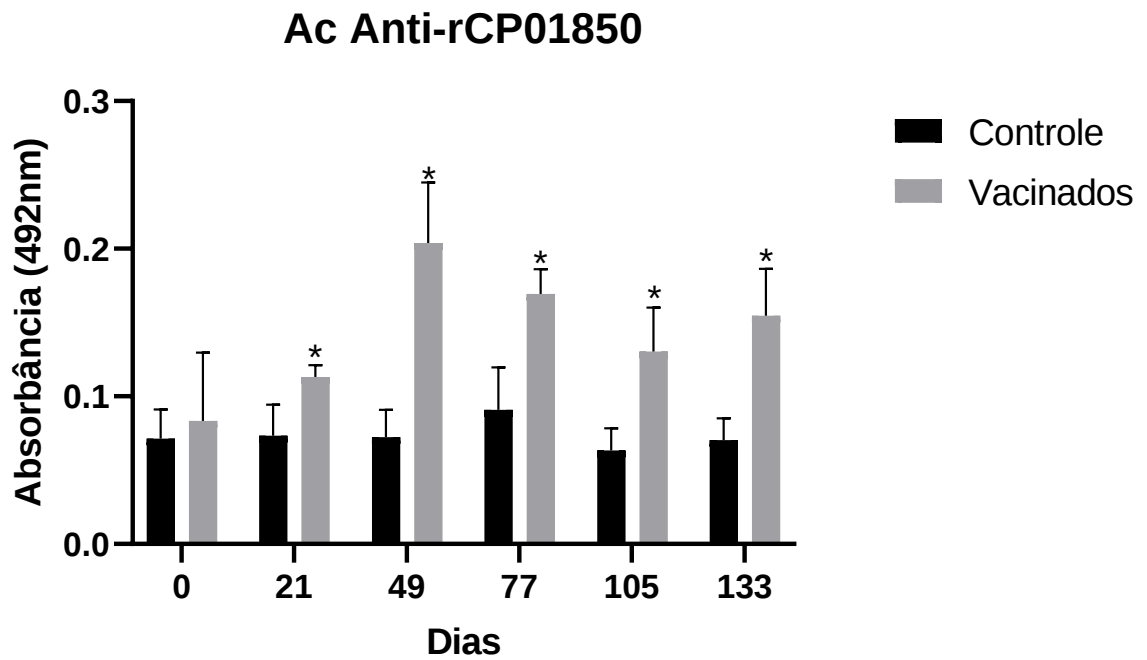
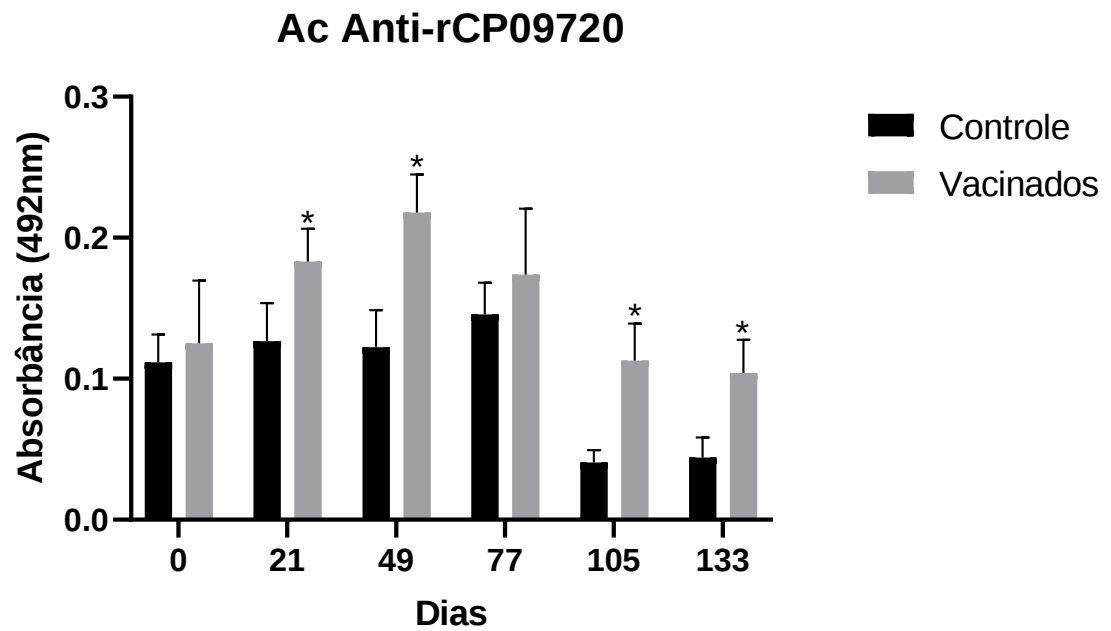


FIGURA 3



REIVINDICAÇÕES

- 1 - VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, caracterizada por compreender três proteínas recombinantes sendo elas: uma fosfolipase D recombinante (rPLD) (SEQ ID NO:1), uma fosfatase ácida rCP01850 (SEQ ID NO:2) e uma esterase rCP09720 (SEQ ID NO:3), associadas a um adjuvante vacinal para a potencialização da resposta imunológica.
- 2 - VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender o sistema de expressão das proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720 ser a *Escherichia coli*.
3. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por compreender o adjuvante saponina.
4. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pela saponina estar presente na quantidade de 1 a 15 mg por dose.
5. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizada por compreender um sistema de veiculação de vacinas, como veículos estabilizantes, excipientes ou intermediários, além de corretivos e outros aditivos.
6. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 5, caracterizada por compreender uma quantidade entre 50 e 500 mg de proteínas recombinantes na sua composição.
7. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 5, e 6 caracterizada por compreender formulação a ser aplicada por via parenteral, preferencialmente subcutânea ou intramuscular, administrada em duas ou mais doses, com intervalo mínimo de 15 dias.
8. VACINA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 5, 6 e 7 caracterizada por compreender formulação a ser utilizada na imunoprofilaxia contra a linfadenite caseosa em pequenos ruminantes.

**FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA CONTENDO ANTÍGENOS
RECOMBINANTES DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA
IMUNOPROFILAXIA DA LINFADENITE CASEOSA**

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se ao processo de produção de vacina multiproteínas contra a linfadenite caseosa a partir de antígenos obtidos pela associação de proteínas recombinantes rCP01850, rCP09720 e rPLD oriundas da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tais antígenos foram utilizados de forma combinada na formulação vacinal associadas ao adjuvante saponina, visando auxiliar na imunomodulação da resposta imunológica. O produto pode ser aplicado na indústria farmacêutica, especificamente em formulações de vacinas veterinárias.

Descrição do estado da técnica

[002] A linfadenite caseosa (LC) é uma doença zoonótica, infectocontagiosa, crônica e debilitante que afeta ovinos e caprinos com ampla distribuição mundial e alta prevalência em rebanhos de pequenos ruminantes, sendo responsável por expressivas perdas econômicas no setor pecuário (FACCIOLI-MARTINS et al., 2014).

[003] O microrganismo causador dessa doença é a bactéria gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a qual é responsável pela formação de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais em sua forma cutânea como também nos gânglios linfáticos internos em sua forma visceral. Durante seu ciclo infeccioso, esta pode se disseminar por vários órgãos do animal infectado como fígado, baço, rins e pulmões o que agrava o quadro do animal resultando em perda de peso, diminuição da produção de lã, leite e diminuição do desempenho reprodutivo, além de perdas econômicas devido ao abate dos animais (BAIRD & FONTAINE, 2007).

[004] A transmissão da LC acontece no ambiente pelo contato direto entre animais saudáveis e doentes, através do exsudato proveniente dos abscessos supurados de animais infectados que eliminam bactérias viáveis capazes de penetrar pela pele lesionada e promover a infecção de um rebanho inteiro. Além disso o patógeno pode

permanecer no ambiente por vários meses, o que implica na sua disseminação pela água contaminada, pelo solo e alimentos (SOUZA et al., 2011). Após penetração do *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, inicia-se a contaminação. E, a bactéria é carregada dentro de células fagocíticas, o que mais tarde culminará no desenvolvimento de um granuloma formado por células do sistema imunológico e as bactérias infectantes. A evolução deste processo é capaz de causar lesões na forma de necrose caseosa (BASTOS et al., 2013).

[005] Atualmente o tratamento para a LC é ineficiente, visto que com a formação dos granulomas, a barreira celular formada impossibilita a penetração dos antibióticos. Assim a utilização destes fármacos se torna dificultada além de não ser viável do ponto de vista econômico, já que estes possuem alto custo (DORELLA et al., 2009).

[006] O método mais utilizado para o controle da LC é o procedimento cirúrgico através da drenagem dos abscessos superficiais seguida da limpeza e cauterização química com Iodo 10%. Porém este só é possível em casos de LC superficial, e assim os abscessos internos por não serem tratados continuam a albergar o patógeno, o torna esse método uma medida ineficaz (DROPPA-ALMEIDA et al., 2018).

[007] Levando-se em conta o cenário atual onde os tratamentos disponíveis são ineficazes e inviáveis economicamente para alguns produtores, a estratégia mais adequada para o controle e prevenção da LC é a vacinação dos animais saudáveis. Apesar da vacinação não eliminar a possibilidade de infecção, dada a inexistência de vacina 100% eficaz no controle da LC, é relevante ressaltar que essa prática colabora para uma redução do número de animais que desenvolvem lesões uma vez que animais mais velhos são abatidos com o tempo, e com isso, o desafio infeccioso diminui, o que significa que menos animais serão infectados (WINDSOR et al., 2014).

[008] Algumas vacinas comerciais para a LC já existem no mercado. Porém a profilaxia através dessas formulações existentes conferem aos animais uma proteção que não é duradoura, como resultado disso, apesar das vacinações de rotina a doença persiste fazendo-se necessário a aplicação de doses de reforços para tentar manter os níveis de proteção, o que implica em maior custo para os produtores e aumento da

possibilidade do desenvolvimento de efeitos colaterais nos animais (PINHO et al., 2021).

[009] As vacinas licenciadas são compostas por combinações de antígenos contra outros patógenos e *C. pseudotuberculosis*. Mas existem também formulações vacinais com outras composições como é o caso das vacinas vivas atenuadas composta somente pelo *C. pseudotuberculosis*, um exemplo disso é a vacina desenvolvida no Brasil que foi licenciada no ano de 2000, baseada na linhagem 1002 atenuada com sua fabricação pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (PATON et. al., 2003). Entretanto apesar de demonstrar em testes experimentais uma taxa de proteção de 83 % nos animais, esses índices não foram demonstrados em campo, além disso, esse tipo de formulação apresenta alguns impasses como a indução de efeitos colaterais nos animais que vão desde a formação de granuloma cutâneo, edema e febre, como queda na produção de leite (RIBEIRO et al., 2014).

[0010] Com o intuito de minimizar esse fator outras estratégias vacinais foram pesquisas e a busca por novos alvos antigênicos ganhou incentivo. Dentre várias formulações estudadas a pesquisa com vacinas de DNA e formulações utilizando proteína recombinantes foram desenvolvidas na busca de se obter resultados mais seguros e eficazes (SILVA et al., 2014). Para o desenvolvimento desses tipos vacinais, são necessários estudos para identificar genes relacionados à virulência bacteriana e com isso identificar genes que codifiquem possíveis proteínas antigênicas (DORELLA et al., 2009).

[0011] As vacinas de subunidades recombinantes são consideradas mais seguras quando se trata da indução de efeitos colaterais, pois geralmente apresentam níveis mais baixos de reações e resultam em taxas de proteção variáveis dependendo do antígeno empregado ou da combinação deste com determinado adjuvante (BRUM et al., 2017). Além disso esse tipo de vacina, juntamente com as vacinas de DNA são considerados atualmente métodos mais econômicos de produção de antígenos livres de materiais exógenos associados às vacinas convencionais (LUBROTH et al., 2007).

[0012] Apesar de apresentarem algumas vantagens em relação às vacinas tradicionais como por exemplo o custo de produção e maior segurança, as formulações vacinais

que utilizam proteínas recombinantes apresentam como inconvenientes o fato de serem pouco imunogênicas devido à alta pureza de seus componentes. Com isso, faz-se necessário adicionar potencializadores imunológicos, também conhecidos como adjuvantes de vacina, na formulação vacinal para aumentar a imunogenicidade (CHRISTENSEN, 2016).

[0013] Nos vários ensaios que buscam o aumento do potencial imunogênico da formulação vacinal, diferentes adjuvantes já foram testados em associação com proteínas recombinantes com o intuito de estimular a resposta imunológica do hospedeiro. De acordo com Rezende et al., (2020) é necessário encontrar a melhor combinação entre antígeno e adjuvante para uma formulação vacinal ideal, até o momento já foram utilizados com essa finalidade: óleo mineral, complemento de freund, hidróxido de alumínio (AlOH), saponina e própolis vermelha. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada em modelo murino, o que, apesar de ser uma etapa crucial no processo de avaliação de novos modelos ou procedimentos, dificulta a extrapolação de informações mais precisas para os animais-alvo para quais é estabelecido na infecção da linfadenite caseosa (PINHO et al., 2021.)

[0014] Pelo exposto, encontrar a combinação perfeita entre o antígeno e o adjuvante que venham a conferir um alto grau de proteção nos animais se torna o maior desafio para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante (REZENDE et al., 2020).

[0015] A busca por uma maior eficácia das formulações vacinais para a LC foi impulsionada pelo advento da bioinformática e o sequenciamento do genoma, através deles tornou-se possível selecionar prováveis candidatos vacinais a partir da informação genômica identificando alvos potencialmente antigênicos, como também foi possível prever a quantidade de proteína madura que é capaz de desencadear uma resposta imune pelo o uso da análise MED – Densidade de Epítomos Maduros, e assim alcançar resultados mais promissores na busca do desenho vacinal ideal (DROPPA-ALMEIDA et al., 2021; REZENDE et al., 2016). Assim os métodos vacinais tradicionais como o uso de toxóides, bacterinas e bactérias vivas atenuadas, vão dando espaço à estratégias mais modernas como a vacinologia reversa, vacinas de subunidades

recombinantes, vacinas de DNA e vetorais as quais têm sido utilizadas na tentativa de induzir imunidade adequada e alta proteção (PINHO et al., 2021).

[0016] Algumas vacinas de subunidade recombinantes já foram produzidas e testadas contra a linfadenite caseosa com várias abordagens diferentes dentre elas uma formulação que utilizou a PLD geneticamente inativada, a qual protegeu 44% dos ovinos quando desafiados contra a *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1999). Outra proteína recombinante a rHSP60 foi testada como imunizante em camundongos a qual não rendeu bons resultados pela morte dos animais em duas semanas após o desafio com cepa virulenta (PINHO et al., 2009). Uma serina protease recombinante rCP40 foi testada em camundongos estando associada a dois adjuvantes diferentes (adjuvante completo de Freund ou saponina) demonstrou propriedades imunogênicas gerando taxa de proteção de até 100% (SILVA et al., 2014; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

[0017] Após o genoma da cepa 1002 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ter sido depositado no GeneBank em 2015, outros alvos que não haviam sido testado ainda ganharam espaço entre novas pesquisas. Em 2018, a combinação dos antígenos: rCP01850 e rCP09720 associados com a rPLD e ao adjuvante saponina resultou em proteção parcial de 50% e 40% em camundongos, respectivamente, após desafio com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Esse trabalho demonstrou o sinergismo de rPLD com as outras duas proteínas de subunidade, visto que essa exotoxina apresentou uma taxa de proteção de apenas 30% quando usada de forma isolada na formulação vacinal em estudos anteriores. Além disso, a combinação também demonstrou respostas imunes inatas e Th1 mais intensas caracterizadas por níveis mais elevados de IFN- γ e TNF em culturas de esplenócitos estimuladas com antígeno (SILVA et al., 2018).

[0018] Os resultados desse estudo sugeriram que a combinação rPLD + rCP01850 pode ser uma potencial vacina candidata a ser testada em ovinos e caprinos, uma vez que foi capaz de gerar uma resposta imune Th1 mais potente do que a observada nos outros grupos do experimento.

[0019] Deste modo, os genes *cp1002_0369* e *cp1002_1957* foram inicialmente anotados do genoma de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 realizada em janeiro de 2014. Contudo em agosto de 2015 houve uma reanotação e os referidos genes passaram a ser identificados como *cp1002_RS01850* e *cp1002_RS09720*, respectivamente.

[0020] O gene da fosfatase ácida (*cp_1002_RS01850*) que apresenta 410 aminoácidos de *C. pseudotuberculosis* foi depositado no GeneBank sob a sequência de referência NCBI: WP_014400988.1 GI: 504213886. Já o gene da esterase (*cp1002_RS09720*) formada por 341 aminoácidos denominado de sofreu sua reanotação no GeneBank, sob o número de acesso WP_013242814 GI: 503007838.

[0021] Os estudos que envolveram a codificação da sequência da proteínas rCP09720 e rCP01850 para uso em vacinas de DNA e de subunidade recombinante foram realizados por inúmeros pesquisadores dentre eles Brum et al. (2017) que utilizam uma formulação baseada em rCP09720 associada a Al(OH) 3 a qual foi capaz de conferir um nível de proteção significativo contra desafio com a cepa virulenta MIC-6. Os resultados demonstraram uma proteção parcial de 58,3% da formulação vacinal. Já a vacina de DNA (pTARGET/cp09720) não foi capaz de conferir proteção significativa.

[0022] Em relação as formulações que envolvem a rCP01850 como vacina de subunidade recombinante, temos como exemplo os estudos de Silva et al., (2018) demonstrando que a associação de rCP01850 com a exotoxina rPLD foi capaz de induzir proteção parcial (50%) dos camundongos contra o desafio com um vírus *C. pseudotuberculosis* cepa e foi associada à produção total de IgG e IgG2a específica significativa, o estudo de Rezende et al., (2020) usando hidróxido de alumínio como adjuvante o qual não foi capaz de conferir proteção significativa e os estudo de Bezerra et al., (2021) que utilizou a saponina como adjuvante vacinal e obteve proteção significativa de 60% quando camundongos foram desafiados. Em outro estudo, a associação desta proteína recombinante à própolis vermelha brasileira (BRP), resultou em proteção significativa de 70% e níveis elevados de IgG (BEZERRA et al., 2020).

[0023] A partir do banco de dados de depósito de patentes é possível obter um panorama de uma parte da produção tecnológica relacionada a desenvolvimento de formulações vacinais para a imunoprofilaxia da linfadenite caseosa.

[0024] Pelo exposto segue as patentes relacionadas com a invenção:

[0025] O documento portador do número **WO1990011351A1** demonstra o potencial da utilização da rPLD em associação com outras proteínas recombinantes em formulações vacinais. E, reivindica um método de purificação da toxina fosfolipase D (PLD) a partir do cultivo de *C. pseudotuberculosis*, bem como o processo de clonagem do gene da toxina PLD e a expressão da PLD recombinante. Este documento relata a utilização da toxina fosfolipase D purificada em formulação vacinal com níveis de proteção de 38% em ovinos.

[0026] Um dos documentos que propõe a utilização de proteínas recombinantes em formulações vacinais é o depósito de patente **BR 102016016891-0 A2**, que reivindica o método de produção do antígeno rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sua caracterização e seu uso em composição de vacinas de subunidade para a linfadenite caseosa, porém os testes se limitaram ao modelo murino.

[0027] Como outros exemplos de composições vacinais propondo a utilização de proteínas recombinantes em formulações são as patentes **BR PI1005625-4** e **CA2078801** que reivindicam, respectivamente, a utilização de um conjunto de peptídeos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* em uma composição vacinal, e a utilização de uma vacina composta por uma fosfolipase D mutante na forma inativa.

[0028] Outra patente depositada, a **BR 102016016754-0 A2** propõe a produção e uso da proteína recombinante purificada de *C. pseudotuberculosis*, a rCP09720 como antígeno vacinal, associada ao adjuvante saponina, com a finalidade de potencializar o efeito protetor de vacinas de subunidade recombinante para a linfadenite caseosa. Para a produção desta esterase, utilizou-se um sistema de expressão heterólogo baseado em *E. coli* e o vetor de clonagem e expressão pAE.

[0029] A patente **BR 102017009371-9 A2** reivindica a utilização da associação das proteínas rPLD com a rCP01850 em uma formulação e em outra formulação da

associação das proteínas rPLD com a rCP09720 de *C. pseudotuberculosis* na avaliação de uma vacina que foi testada em modelo murino. Porém, não há a demonstração, nesse documento citado, da associação das 3 proteínas (rPLD, rCP01850 e rCP09720) juntas em uma só formulação vacinal associada ao adjuvante saponina e testada em modelo ovino, que é o objeto da presente patente.

[0030] É conhecido que a combinação de diferentes antígenos do mesmo patógeno em uma formulação vacinal pode resultar em diferentes níveis de proteção (REED et al., 2008). Dessa forma a pesquisa através de formulações diferentes corroboram para desenvolver uma vacina mais eficaz e protetora. Assim, verifica-se que os antígenos apresentados nessa formulação já foram utilizados de forma isolada e combinada onde demonstraram resultados satisfatórios. Entretanto, não foram experimentados de forma associada como multiproteína na combinação proposta neste desenho vacinal em que os três alvos rCP01850, rCP09720 e rPLD são unidos na mesma formulação juntamente com a saponina para que seja observada a sua eficácia e segurança na espécie alvo, já que, até o presente momento os experimentos envolvendo essas proteínas recombinantes só foram realizados em camundongos e a presente invenção propõe o teste na espécie alvo e realizou a fase experimental em ovinos.

[0031] Pelo exposto, verifica-se a importância da presente invenção, que visa fornecer uma formulação vacinal composta por um mix de proteínas recombinantes como uma opção para a formulação de vacinas contra a linfadenite caseosa. Levando-se em conta que até o presente momento nenhuma composição vacinal com estes antígenos foi testada na espécie alvo o que implica em uma composição mais específica, visto que o sistema imunológico de camundongos apresenta particularidades próprias da espécie, sendo assim diferente dos ruminantes. Assim, pode-se incluir no mercado uma vacina com previsibilidade, segurança e alto potencial para indústria de vacinas veterinárias.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0032] A presente invenção refere-se à produção e uso da associação de proteínas recombinantes rCP01850, rCP09720 e rPLD de *C. pseudotuberculosis* como antígeno vacinal associada ao adjuvante saponina, capaz de induzir elevação significativa de

anticorpos do tipo IgG de forma sustentada por até cerca de 3 meses. Mais especificamente a invenção compreende a associação da rPLD, que se apresenta como o maior fator de virulência conhecido para a LC, combinado com as proteínas recombinantes purificadas rCP01850 e rCP09720 para a produção de uma composição vacinal com o adjuvante saponina. Estes alvos foram descritos como os mais promissores pela análise de Densidade de Epítomos Maduros (MED) no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a linfadenite caseosa.

[0033] Com isso a presente estratégia demonstra inúmeras vantagens quando comparadas a outros produtos, visto que essa associação proteica não apresenta riscos como os apresentados por vacinas atenuadas e inativadas por ser uma vacina composta de antígenos purificados, além de unir pontos satisfatórios em relação a toda pesquisa realizada para a imunoprevenção da linfadenite caseosa.

Breve descrição dos desenhos

[0034] A figura 1 apresenta a comparação dos níveis de anticorpos anti-rPLD nos grupos vacinado e não-vacinado obtidos no ensaio de resposta humoral ao longo do período experimental. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (492 nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo. O (*) representa diferença estatística entre os grupos.

[0035] A figura 2 apresenta a comparação dos níveis de anticorpos anti-rCP01850 nos grupos vacinado e não-vacinado obtidos no ensaio de resposta humoral ao longo do período experimental. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (492 nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo. O (*) representa diferença estatística entre os grupos.

[0036] A figura 3 apresenta a comparação dos níveis de anticorpos anti-rCP09720 nos grupos vacinado e não-vacinado obtidos no ensaio de resposta humoral ao longo do período experimental. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (barras) das absorbâncias (492 nm) encontradas no ensaio de ELISA indireto para cada grupo. O (*) representa diferença estatística entre os grupos.

Descrição detalhada da invenção

Cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Escherichia coli*

[0037] Para o cultivo das cepas de *C. pseudotuberculosis* (MIC6 e Cp1002) foram utilizados o meio *Brain Heart Infusion Broth* (caldo BHI) ou BHI-Ágar a 37 °C por 48 horas em shaker orbital a 130 rpm ou estufa bacteriológica a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Quando for utilizado o caldo BHI, um quantitativo de 0,05% de Tween 80 será adicionado ao meio. O cultivo da cepa de *E. coli* transformada será feito em meio Luria-Bertani (LB) líquido ou LB-Ágar, acrescido de ampicilina (na concentração de 100 µg/mL e proporção antibiótico:meio de 1:1000) em shaker orbital a 130 rpm ou estufa bacteriológica a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Expressão e purificação das proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD

[0038] As proteínas recombinantes foram expressas segundo uma metodologia previamente descrita por Rezende et., al (2016). Primeiramente os alvos foram selecionados adotando o trabalho publicado por Santos et., al (2013), chamado de pontuação de pontuação, o qual classificava as proteínas de acordo com a concentração de epítomos, podendo prever assim as mais imunogênicas. Com isso as proteínas abordadas nesse estudo estão entre as mais imunogênicas. Os genes *cp1002_RS01850*, *cp1002_RS09720* e *pld* foram clonados no vetor pAE (RAMOS et., al., 2004) e caracterizados, e os plasmídeos recombinantes pAE/pld, pAE/01850, pAE/09720 contendo a CDS correspondente às proteínas rPLD, rCP01850, e rCP0970 foram construídos e inseridos no vetor de expressão *E. coli* BL21 Star através de choque térmico e a indução se dá pela adição de IPTG ao cultivo mantido sob agitação orbital a 37 °C por 3 horas. Em seguida, o cultivo de *E. coli* foi centrifugado e suspenso em um tampão de lavagem (200 mM NaH₂PO₄; NaCl 500 mM, Imidazol 5 mM; Ureia 8 M pH 8,0) com lisozima (100 mg/mL) e submetida à sonicação. A confirmação da expressão foi feita através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6X-His conjugado com peroxidase (Sigma). A diálise foi realizada em sistema baseado em tubo de celulose (Sigma-Aldrich, EUA). A purificação é realizada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap) carregada com níquel. A pureza das mesmas foi determinada através de gel de SDS-PAGE 12% e a concentração de proteínas foi determinada pelo Kit BCA (Pierce). Em relação à expressão das proteínas

recombinantes, foram obtidos os rendimentos de 3,669 g/L da rPLD, 5,376 g/L da rCP01850, e 2,217 g/L da rCP09720.

[0039] As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes rPLD (SEQ ID NO:1), rCP01850 (SEQ ID NO:2) e rCP09720 (SEQ ID NO:3), estão descritas na listagem de sequências. Essas proteínas apresentaram bandas reativas ao western blot com pesos moleculares de aproximadamente 31, 33,5 e 35 kDa, respectivamente. As proteínas recombinantes produzidas no presente invento são formadas pela seguinte quantidade de aminoácidos 275 (rPLD), 307 (rCP01850) e 315 (rCP09720).

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Exemplo 1 – Preparo da composição vacinal

[0040] A formulação vacinal é composta por 100 µg de cada proteína por dose de vacina, sendo composta da seguinte forma: 100 µg da rCP01850, 100 µg da rCP09720 e 100 µg da rPLD totalizando um quantitativo de 300µg do mix de proteínas purificadas para cada dose de vacina associado a 50 µL adjuvante saponina (equivalente a 5 mg/dose) em um volume final de 1 mL. Portanto, em uma vacina com o volume final de 1 mL, adiciona-se 950µL dos componentes (proteínas diluídas em PBS 1x autoclavado) mais 50 µL da saponina estoque (100mg/mL).

[0041] O adjuvante *Saponina quillaja* sp. contendo 20-35% de sapogenina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado na formulação, o qual foi preparado pesando-se 0,5 g de saponina e diluindo-o em 5 mL de água ultrafiltrada, gerando uma solução de estoque de 100 mg/mL, submetida a uma filtração esterilizante em filtros de 0,22 µm. Armazenada a 4° C até o momento do uso.

Exemplo 2 - Avaliação da imunogenicidade

A avaliação da imunogenicidade das proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD em ovinos foi realizada através de *Western blot* utilizando anticorpo anti ovino. Cada proteína foi acrescida de um tampão de amostra (100 nM de Tris/HCl, pH 6,8; 100 nM 2-β-mercaptoetanol; 4 % de SDS, 0,2 % de azul de bromofenol e 20 % de glicerol), aquecida sob condições redutoras a 100 °C por 10 min e então submetida a

eletroforese em SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com PBS acrescido de leite em pó desnatado a 5% (2,5 g de leite + 50 mL de PBS 1x gelado) por 30 minutos a 37 °C. A membrana foi lavada três vezes com PBS 0,05 % Tween 20 (PBS-T) por 5 minutos cada e incubada com soro ovino diluído em PBS-T (1:100) por 1 h a 37 °C. Foram utilizados como soros positivos de ovinos apresentando linfadenite caseosa clínica, e com o isolamento microbiológico do agente. Os soros negativos foram coletados de ovinos jovens (idade inferior a 6 meses), provenientes de propriedades sem histórico de LC (área não endêmica), e que tenham se apresentando negativos em um ELISA utilizando proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*. Após três lavagens com PBS-T, foi adicionado o conjugado anti-ovino marcado com peroxidase na diluição de 1:5000 em PBS-T e incubado a 37 °C por 1 h. As bandas de proteínas reativas ao anticorpo serão reveladas usando a solução de revelação composta por 0,012g de diaminobenzidina-tetrahydroclorido (DAB) + 1 mL de sulfato de Níquel a 0,3% + 9 mL de tampão TRIS-HCl 50mM pH: 7,6 + 50µL de peróxido de hidrogênio. Observou-se a presença das bandas reativas com pesos moleculares de aproximadamente 31, 33,5 e 35 kDa, para as proteínas rPLD, rCP01850 e rCP09720, respectivamente.

Exemplo 3 - Ensaio de imunização, desafio e caracterização das lesões anatomopatológicas

[0042] As vacinas foram utilizadas nos grupos experimentais compostos por 12 ovinos, sendo com 6 animais no grupo controle e 6 animais que foram imunizados com o mix de proteínas recombinantes ambos foram vacinados por via subcutânea. O experimento em ovinos ocorreu no período de agosto de 2022 a fevereiro de 2023. Os animais foram alocados em baias do Núcleo de estudos e pesquisa em pequenos ruminantes (NEPPER) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, mediante parecer nº 14/2022

[0043] Para a inoculação os grupos foram divididos da seguinte forma: 1. Grupo controle, inoculado com solução salina 0,9% (controle negativo); 2. Grupo experimental,

inoculado com mix de proteínas (rPLD + rCP01850 + rCP09720) + saponina, preparado conforme descrito no exemplo 1.

[0044] As proteínas recombinantes foram utilizadas na quantidade de 100 µg de cada proteína por dose (RODRIGUES et al., 2021), acrescida do adjuvante saponina na quantidade de 5 mg/dose de vacina (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2018). As vacinas foram administradas em uma dose final de 1 mL e os animais imunizados com 2 doses de vacina intervaladas por 21 dias da seguinte forma: dia 0 inoculação da 1ª dose da vacina e no dia 21 inoculação da 2ª dose da vacina (reforço).

[0045] O desafio ocorreu 30 dias após a última imunização, onde todos os animais foram desafiados utilizando 1 mL contendo 10⁵ UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* por via subcutânea. Seguindo-se com a avaliação de exame clínico dos animais semanalmente visando a detecção de lesões, presença de possíveis reações adversas locais das vacinas e avaliação da temperatura retal por 30 dias após o desafio, para posterior eutanásia.

Avaliação da taxa de redução das lesões

[0046] Doze semanas após o desafio, os animais foram eutanasiados, através do aprofundamento do plano anestésico com propofol, e necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFERSA. Os ovinos foram submetidos ao exame anatomopatológico. Os principais órgãos que podem ser acometidos na LC (como pulmões, fígado, rins e baço) foram analisados quanto aos aspectos macroscópicos. Os linfonodos superficiais e os internos também foram examinados em busca de granulomas em cada um desses órgãos. Assim, foram analisados os linfonodos: pré escapulares, parotídeos, mesentéricos e poplíteos.

[0047] Dentre os órgãos internos, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos, com ausência de lesões macroscópicas nos pulmões, fígado, rins e baço. Entretanto, foram encontradas lesões macroscópicas nos linfonodos avaliados. Justamente por isso, foram adotados scores para a classificação das lesões nos linfonodos afim de se obter a taxa de redução de lesões.

[0048] Tabela 1. Características morfológicas e sua correlação com os escores das lesões encontradas nos linfonodos de ovinos.

Escore	Achados macroscópicos de acordo com o escore
0/3	Linfonodos normais ou um pouco aumentados
1/3	Linfonodos aumentados
2/3	Linfonodos aumentados com hemorragia ou congestão
3/3	Linfonodos aumentados com necrose ou abscessos

[0049] O cálculo dos escores da pontuação por grupo de linfonodos teve por base as seguintes pontuações máximas: 1. Pontuação máxima para cada linfonodo (03); 2. Pontuação máxima para cada animal ($7 \times 3 = 21$); 3. Pontuação máxima para cada grupo ($6 \times 21 = 126$). Para análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA), onde os escores foram analisados quanto a sua normalidade. Por se tratarem de dados anormais e não-paramétricos, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, sendo valor de $p < 0,05$ para diferença estatística significativa.

[0050] Quadro 2. Escores de lesões encontradas em linfonodos de ovinos do grupo controle e experimental, imunizado com a formulação vacinal desenvolvida nesta patente, bem como a comparação entre os grupos. (*) Representa diferença significativa entre os grupos.

		Lesões nos linfonodos							Score total por grupo*	Índice de indução de lesão*	Taxa de redução relativa de lesões
		Pré-escapular		Parotídeo		Poplíteo		Mesentérico			
Grupo de ovinos	Animal	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo				
G1 (solução salina)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	+ (1/3)	36/126	0,286	86,11%
	A2	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (rCP0972 0 + rCP01850 + rPLD)	A7	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	5/126	0,039	
	A8	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A9	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A10	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A11	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A12	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

[0051] Observou-se que a formulação vacinal desenvolvida foi capaz de induzir uma redução expressiva e significativa de 86,11% das lesões nos linfonodos no grupo vacinado em relação ao grupo controle.

Exemplo 4 - Avaliação da resposta imune humoral

[0052] A avaliação da resposta imune humoral foi feita através da detecção dos níveis de anticorpos específicos contra os antígenos recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP09720 por ELISA. Para isto, amostras de sangue foram coletadas dos ovinos um dia antes da primeira imunização (Dia 0) e, posteriormente nos dias 21, 49, 77, 105 e 133 do experimento, das quais foram obtidos os soros que ficaram armazenados a temperatura de -20°C até a realização da dosagem por ELISA indireto conforme metodologia descrita por Rezende (2016).

[0053] Para detecção dos níveis de IgG específicos para as proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD foram realizados ensaios de ELISA indireto com os soros dos animais do grupo do teste desafio, para medição dos níveis de IgG total e avaliação de anticorpos contra as proteínas recombinantes rCP01850, rCP09720 e rPLD sendo as dosagens feitas em placas de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL da solução contendo tampão carbonato-bicarbonato 50mM pH 9,6 e a quantidade de proteínas recombinante de acordo com a distribuição abaixo: ELISA 1: 0,5 µg/mL de rPLD (ELISA anti-rPLD); ELISA 2: 2 µg/mL de rCP01850 (ELISA anti-rCP01850); ELISA 3: 1 µg/mL de rCP09720 (ELISA anti-rCP09720);

[0054] As placas foram incubadas por 16 h a 4 °C e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS 1 x, pH 7,2 acrescido de Tween 20 a 0,05 %) e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-T e 5 % de leite desnatado por 2 h a 37 °C. Seguindo de três lavagens com PBS-T e adição de 50 µL/poço das amostras dos soros de ovinos (1:400 para rPLD, 1:200 para rCP01850 e 1:100 para rCP09720 em PBS-T + 1 % de leite desnatado) em duplicatas. Após uma hora de incubação a 37 °C e 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo conjugado com a peroxidase anti-IgG Total de ovino na diluição de 1:5000 em PBS-T com 1 % de leite desnatado. Após 45 minutos de incubação a 37 °C e 5 lavagens com PBS-T, 100 µL/poço de solução reveladora [0,03 g de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldric) diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato pH 4 e 50 µL de H₂O₂] foram adicionados, sendo as placas embaladas com alumínio e armazenadas no escuro a temperatura ambiente durante 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL/poço da solução de parada

contendo ácido sulfúrico 4 N. A absorbância foi medida a 492 nm utilizando um leitor de placas de ELISA.

[0055] Para detecção dos níveis de IgG específicos para as proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD foram realizados ensaios de ELISA indireto com os soros dos animais do grupo do teste desafio, para medição dos níveis de IgG total e avaliação de anticorpos contra as proteínas recombinantes rCP01850, rCP09720 e rPLD sendo as dosagens feitas em placas de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL da solução contendo tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 e a quantidade de proteínas recombinante de acordo com a distribuição abaixo: ELISA 1: 0,5µg/mL de rPLD (ELISA anti-rPLD); ELISA 2: 2µg/mL de rCP01850 (ELISA anti-rCP01850); ELISA 3: 2µg/mL de rCP09720 (ELISA anti-rCP09720);

[0056] As placas foram incubadas por 16 h a 4°C e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-T e 5% de leite desnatado por 2 h a 37°C. Seguindo de lavagem com PBS-T e adicionadas de 50 µL/poço das amostras dos soros de ovinos (1:50 em PBS-T) em duplicatas. Após uma hora de incubação a 37°C e 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo conjugado com a peroxidase anti- IgG Total de ovino na diluição de 1:5000. Após uma hora de incubação a 37°C e 5 lavagens com PBS-T, 100 µL/poço de solução reveladora [200pmoles ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldric) diluído em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH 5 e 0,05% H₂O₂] foram adicionados. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço da solução de parada contendo ácido sulfúrico 4 N. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA.

[0057] As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8 para windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças entre a produção de IgG nos referidos grupos experimentais foram verificadas através do one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de p menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

[0058] Ao analisar os gráficos, obtidos pelos resultados do ELISA observou-se que os índices de produção de anticorpos anti-rCP01850 e anticorpos anti-rCP09720 aumentaram significativamente no dia 49, não sendo observada diferença no dia 0 para

ambos anticorpos e no dia 77 para o anti-rCP09720. Já os anticorpos anti-rPLD tiveram seus níveis mais elevados no dia 133 não sendo observada diferença entre os dias 0 e 21.

[0059] O aumento da produção de anticorpos estatisticamente significativos possibilita inferir que a vacina formulada com as diferentes proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD associadas ao adjuvante saponina foi capaz de promover aumento nos níveis de IgG específico de forma sustentada por até aproximadamente 3 meses, sendo portanto, capaz de ativar as células B na produção de anticorpos.

REFERÊNCIAS

BAIRD, G. J., FONTAINE, M.C.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **J Comp Pathol**, 137:179-210. 2007.

BASTOS, B.L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J.T. *et al.* Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC Vet. Res.**, v.13, p.254, 2013.

BEZERRA, F.S.B.; SILVA, M.T.O.; REZENDE, A.F.S. *et al.* Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, [s. l.], v. 39, n. 18, p. 2568–2574, 2021.

BEZERRA, F.S.B., REZENDE, A.F.S.; SILVA, M.T.O. *et al.* The combination of Brazilian red propolis and recombinant protein rCP01850 in the immunoprophylaxis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 149, n. 104354, 2020.

BRUM, A.A.; REZENDE, A.D.F.S.; BRILHANTE, F.S.B. *et al.* Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **J Med Microbiol** ;66(5):635–42. 2017.

CHRISTENSEN, D. Vaccine adjuvants: Why and how. **Hum Vaccin Immunother** 12: 2709–2711. 2016.

DORELLA, A.D.; PACHECO, L.G.; SEYFFERT, N. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development, **Expert Review of Vaccines**, 8:2, 205-213, 2009.

DROPPA-ALMEIDA, A. D.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F. F. Immuneinformatic analysis and design of peptide vaccine from multiepitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinform Biol Insights**, v. 12, p. 1–9, 2018.

DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W.L.P.; SILVA, K.K.O. et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p. 1091– 1096, 2016.

DROPPA-ALMEIDA D.; SILVA G.A.; GASPAR, L.M.D.A.C. et al. Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. **PLoS One**, v. 16, n. 11, e0256864, 2021.

FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle. **EMBRAPA Caprinos e Ovinos**. Sobral, CE. 2014.

HODGSON, A.; 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.

GONZÁLEZ-SANCHES, M.E., CUQUERELLA, M. & ALUNDA, J.M. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. **Plos ONE**. 13 (3): e0193118, 2018.

LUBROTH, J., RWEYEMAMU, M.M., VILJOEN, G. et al. Veterinary vaccines and their use in developing countries. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz**, 26:179–201. 2007.

PATON, M.W. WALKER, S.B. ROSE, I.R. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Aust Vet J**. 81:91–5, 2003.

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

PINHO, R.B.; SILVA, M.T.O.; BEZERRA, F.S.B. et al. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, p. 2287-2296, 2021.

RAMOS, C.R.R.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L.T.O. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1103–1109, 2004

REED, S.G. BERTHOLET, S. COLER, R.N. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**; 30 (1): 23–32. 2009.

REZENDE, A.F.S., BRUM, A.A., REIS, C.G. et al. *In silico* identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **J. Med. Microbiol.**, 2016.

REZENDE, A.F.S.; BRUM, A.A.; BEZERRA, F.S.B. et al. Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Braz J Vet Anim Sci**. v. 72, n. 1, p. 199- 207, 2020.

RIBEIRO, D.; ROCHA, F.; LEITE, K.M.; et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research** , v. 45, p. 28, 2014.

RODRIGUES, R.R., FERREIRA, M.R.A., DONASSOLO, R.A et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. **Anaerobe**. 69. p. 102326. 2021.

SILVA, J.W., DROPPA-ALMEIDA, D., BORSUK, S. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 Recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis, **BMC Veterinary Research**, v.10, p.1–8, 2014.

SILVA, M.T.O.; BEZERRA, F.S.B.; PINHO, R.B. et al. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v.36, p.74-83, 2018.

SOUZA, M.F.; CARVALHO, A.Q.; JÚNIOR, G.F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31(3), p .224-230, 2011.

WINDSOR, P.A. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, London, v. 5, p. 1-12, 2014.

RESUMO

FORMULAÇÃO VACINAL MULTIPROTEICA CONTENDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA IMUNOPROFILAXIA DA LINFADENITE CASEOSA

A presente invenção refere-se à utilização da associação das proteínas recombinantes antigênicas rCP01850, rCP09720 e rPLD sintetizadas a partir de genes de *C. pseudotuberculosis*, em vacinas recombinantes de subunidade para linfadenite caseosa. Tal invenção objetiva sanar a problemática vinculada às reações adversas locais e sistêmicas presentes em vacinas comerciais disponíveis. Até o momento, essa é primeira formulação vacinal contra a linfadenite caseosa, contendo essa associação destas três proteínas recombinantes em uma mesma formulação acrescida do adjuvante saponina, que foi testada em ovinos. Os resultados obtidos demonstraram o aumento da produção de anticorpos IgG anti-proteínas rCP01850, rCP09720 e rPLD de forma sustentada por até 3 meses após a realização do esquema vacinal completo de 2 doses intervaladas por 21 dias. A formulação foi capaz de induzir uma taxa de redução de lesões significativa de 86,11% nos linfonodos à análise macroscópica, corroborando o potencial imunoprolático da formulação. O invento está enquadrado nos campos de invenção A61K 39/00, A61K 39/02, A61K 39/05 da classificação internacional de patentes

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências - Vacina Multiproteína - Francisco
- Data de Geração do Código: 18/12/2023
- Hora de Geração do Código: 11:33:22
- Código de Controle:
 - Campo 1: FB1291882D8C566E
 - Campo 2: DEA5893C1B064934