



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAIO LOPES BORGES ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR
CITOMETRIA DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS
SECRETADOS DE DIFERENTES CEPAS DE**
Corynebacterium pseudotuberculosis

Salvador

2019

CAIO LOPES BORGES ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITOMETRIA
DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE
DIFERENTES CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM*
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia para defesa do título de Mestrado.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Songeli Menezes Freire
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilia Moura Costa

Salvador

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


Lopes Borges Andrade, Caio
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITOMETRIA
DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE
DIFERENTES CEPAS DE *Corynebacterium*
pseudotuberculosis / Caio Lopes Borges Andrade. --
Salvador, 2019.
51 f. : il

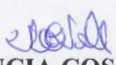
Orientador: Songeli Menezes Freire.
Coorientador: Lilia Ferreira Moura-Costa.
Dissertação (Mestrado - Pós Graduação em
Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia,
Instituto de Ciências da Saúde, 2019.

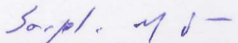
1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. Contagem
Bacteriana. 3. Sororreatividade Humana. I. Menezes
Freire, Songeli. II. Ferreira Moura-Costa, Lilia .
III. Título.




Ata da sessão pública do Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBIOTEC), realizada em 22/05/2019 para procedimento de defesa da Dissertação de MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA no. 92, do candidato CAIO LOPES BORGES ANDRADE, intitulada: "AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITOMETRIA DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*". Às 09:00 do citado dia, no Auditório da Congregação, no 2º andar, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, foi aberta a sessão pela presidente da banca examinadora, Profª. Dra. SONGELI MENEZES FREIRE, que apresentou os outros membros da banca: Prof. Dr. ROBSON BAHIA CERQUEIRA e Profª. Dra. VERA LUCIA COSTA VALE. Em seguida, foram esclarecidos os procedimentos pelo presidente que passou a palavra ao examinado para apresentação do trabalho de Mestrado. Ao final da apresentação, passou-se à arguição por parte da banca, a qual, em seguida, reuniu-se para a elaboração do parecer. No seu retorno, foi lido o parecer final a respeito do trabalho apresentado pelo candidato, tendo a banca examinadora aprovado o trabalho apresentado, sendo esta aprovação um requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Em seguida, nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão pelo presidente da banca, tendo sido, logo a seguir, lavrada a presente ata, abaixo assinada por todos os membros da banca.


Dr. ROBSON BAHIA CERQUEIRA, UFRB
Examinador Externo à Instituição


Dra. VERA LUCIA COSTA VALE, UNEB
Examinador Externo à Instituição


Dra. SONGELI MENEZES FREIRE, UFBA
Presidente


CAIO LOPES BORGES ANDRADE
Mestrando

RESUMO

Introdução: *Corynebacterium pseudotuberculosis* responsável pela Linfadenite Caseosa (LC), doença infecto-contagiosa, de caráter crônico, que geralmente acomete pequenos ruminantes comprometendo a economia dos pequenos produtores e das regiões que contam com o agronegócio. A infecção em humano ocorre pelo manejo de animais, consumo de seus derivados crus ou em laboratórios, com poucos casos descritos e apenas um estudo no Brasil. O diagnóstico animal é relativamente simples, mas de humanos apresenta complicações. O cultivo bacteriológico proveniente do conteúdo caseoso, seguido por testes bioquímicos constitui atualmente o teste padrão ouro. **Objetivo:** O presente trabalho se propõe a avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos para avaliação da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Métodos:** Para contagem bacteriana e estudo da viabilidade celular em FACSCalibur (BD) foram realizados cultivos da cepa VD57 para os três tempos (24, 48, 72 horas) e comparação com cepas CAP3W(21) e CAPJ4(76) em 24 e 48 horas. Para produção do antígeno, foi utilizado o sobrenadante do cultivo com 48 horas das cepas VD57, CAP3W(21) e CAPJ4(76), semi-purificados por técnica de partição em três fases (TPP). Foi produzido extrato em meio com e sem Tween somente para cepa CAPJ4(76). O perfil eletroforético dos quatro extratos foi analisado por SDS-PAGE em gel 12% e a sororreatividade avaliada em Western Blot com *pool* de amostras séricas do grupo Não Contactante (composto por 4 participantes sem histórico de contato com a bactéria ou consumo de carne crua ou mal cozida), grupo Contactante laboratório (composto por 4 indivíduos com histórico de contato por atividade em laboratório de microbiologia) e grupo Contactante fazenda (composto por 4 indivíduos com histórico de contato com animais infectados). **Resultado:** Na avaliação por FACs, evidenciou-se crescimento celular mais acelerado para cepa VD57 com resultado 10 vezes superior ao registrado por CAP3W(21) e CAPJ4(76). O ápice da viabilidade celular registrado foi de 48 horas, porém não foi identificada variação considerável da mortalidade celular com 72 horas. O perfil eletroforético dos extratos produzidos revelou diferenças na expressão de proteínas entre as três cepas, bem como para cultivos em condições diferentes para CAPJ4(76). Foi registrada intensa sororreatividade humana aos quatro extratos, confirmando a presença de proteínas antigênicas em todas as cepas, porém foi possível identificar diferença no perfil de reconhecimento entre os grupos Contactantes e Não Contactantes apenas no extrato VD57. **Conclusão:** A cepa VD57 apresenta ápice do crescimento e viabilidade no tempo de 48 horas de cultivo e na comparação entre as três cepas, demonstra crescimento e viabilidade superiores ao das demais. O perfil eletroforético dos extratos de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e diferença no peso molecular. A utilização de Tween-80 no meio de cultivo, gera um acréscimo de 50% no número de bandas para CAPJ4(76). Todos os extratos produzidos apresentam antigenicidade para soro humano, porém é possível evidenciar diferença no perfil de Contactantes do perfil de Não Contactantes apenas em VD57.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Contagem Bacteriana; Sororreatividade Humana

ABSTRACT

Introduction: *Corynebacterium pseudotuberculosis* responsible for Caseous Lymphadenitis (LC), a chronic infectious-contagious disease, that usually affects small ruminants, compromising the economy of small producers and of the regions that count on agribusiness. The infection in human occurs by the handling of animals, consumption of its raw derivatives or in laboratories, with few cases described and only one study in Brazil. Animal diagnostics are relatively simple, but human has complications. Bacteriological culture derived from cheesy content, followed by biochemical tests is currently the gold standard test. **Purpose:** The present work aims to evaluate and compare bacterial growth and antigen production to evaluate the human seroreactivity of three strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Methods:** For bacterial counts and cell viability study in FACSCalibur (BD) cultures of the VD57 strain for the three times (24, 48, 72 hours) and comparison with strains CAP3W (21) and CAPJ4 (76) were carried out in 24 and 48 hours. For the production of the antigen, the supernatant of the VD57, CAP3W (21) and CAPJ4 (76), semi-purified by three phase partitioning (TPP) strains was used with 48 hours culture supernatant. Extract was produced in medium with and without Tween only for CAPJ4 strain (76). The electrophoretic profile of the four extracts was analyzed by SDS-PAGE in 12% gel and the Western blot analysis was performed with a pool of serum samples from the non-contacting group (composed of 4 participants with no history of contact with the bacteria or consumption of raw or (consisting of 4 individuals with contact history for activity in a microbiology laboratory) and the group contacting farm (composed of 4 individuals with a history of contact with infected animals). **Results:** FACs showed faster cell growth for VD57 strain with a 10-fold higher result than CAP3W (21) and CAPJ4 (76). The peak of the recorded cell viability was 48 hours, but no significant variation in cellular mortality was identified at 72 hours. The electrophoretic profile of the extracts produced revealed differences in protein expression among the three strains, as well as for cultures under different conditions for CAPJ4 (76). Human seroreactivity was recorded in the four extracts, confirming the presence of antigenic proteins in all strains, but it was possible to identify difference in the profile of recognition between the groups Buyers and Non Contacters only in the extract VD57. **Conclusion:** The VD57 strain shows growth apex and viability in the 48 hours of culture and in the comparison between the three strains, it shows growth and viability superior to the others. The electrophoretic profile of the extracts of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains cultivated under the same conditions, present similarity in the number of bands and difference in molecular weight. The use of Tween-80 in the culture medium generates a 50% increase in the number of bands for CAPJ4 (76). All the extracts produced present antigenicity for human serum, however it is possible to show a difference in the Profile of the Contacters of the Non Contact Only profile in VD57.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Bacterial Count; Human Sorority

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Cultura de <i>C. pseudotuberculosis</i> em meio Ágar sangue e em BHI Caldo.....	17
Figura 02: Fluxograma da metodologia.....	29
Figura 03: Contagem bacteriana por FACs.....	31
Figura 04: Análise de eletroforese dos extratos semipurificadas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	35
Figura 05: Western blot dos antígenos de <i>C. pseudotuberculosis</i> com soro humano.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Análise da concentração e viabilidade celular das três cepas.....	33
Quadro 02: Relação de bandas proteicas presentes de PM coincidentes no gel de eletroforese SDS-PAGE 12%.....	35
Quadro 03: Relação de PM de bandas reconhecidas nos diferentes extratos com reconhecimento pelos grupos contactantes e não contactantes.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Percentual

°C – Graus Celsius

β - Beta

< - Menor Que

= - Igual

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μm - Micrometro

~ - Aproximadamente

ADC - Conversor Análogo para Digital

Ag-Ac – Antígeno-Anticorpo

anti-IgG – Anticorpo Anti-Anticorpo G

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B - Branco

bac/μL – Bacterias por Microlitro

bac/mL – Bacterias por Mililitro

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

C. - *Corynebacterium*

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEP - Conselho de Ética em Pesquisa

cm - Centímetro

c/T – Com Tween

D.O. – Densidade Optica

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

FACs – Citometria de Fluxo

FAZ - Fazenda

FL-1 – Intensidade de Fluorescência 1

FL-2 - Intensidade de Fluorescência 2

FSC - Dispersão Frontal

GenBank - Genetic sequence database

g/L – Grama por Litro

h - Hora

hs - Horas
HCl - Ácido Clorídrico
ICS - Instituto de Ciências da Saúde
IgG - Imunoglobulina G
IGRA - Ensaio de Liberação de Interferon Gama
IP – Iodeto de Propídio
KDa - Kilodalton
L - Litro
LAB - Laboratório
LABIMUNO - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
LAMABI - Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia
LC - Linfadenite Caseosa
LL – Low Left
LR – Low Right
M - Molar
mA - Miliampere
mg/mL – Miligrama por Mililitro
mm - Milímetro
MS – Ministério da Saúde
Mtb - Mycobacterium tuberculosis
Nº - Número
Ñ.C – Não Contato
NC - Nitrocelulose
nn - Nanometro
PBS - Tampão Fosfato-Salino
PBS-Tween - Tampão Fosfato-Salino-Tween
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
pH - Potencial Hidrogeniônico
PLD - Phospholipase D
PM – Peso Molecular
PPD - Derivado Proteico Purificado
QTF - Quantiferon
RPM – Rotações por Minuto
SDS – Sódio Dodecil Sulfato

SDS-PAGE - Separação Proteica em Gel de Poliacrilamida

SSC - Dispersão Lateral

s/T – Sem Tween

TCT – Teste Cutâneo Tuberculínico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

TFS - Tampão Fosfato-Salino

TPP – Partição em Três Fases

UFBA - Universidade Federal da Bahia

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UL – Up Left

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco

UR - Up Right

V - Volt

xG – Vezes Força Gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e a Linfadenite Caseosa.....	14
2.2	O diagnóstico clínico e laboratorial da LC	16
2.2.1	Diagnóstico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em animais 16	
2.2.2	Diagnóstico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em humanos 19	
2.3	Contagem bacteriana	20
3	OBJETIVO	22
3.1	Objetivos gerais.....	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	CAPITULO I: Análise de métodos de contagem bacteriana e produção de antígenos secretados de diferentes cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 23	
4.1	RESUMO.....	23
4.2	INTRODUÇÃO	24
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.3.1	Aspectos éticos.....	25
4.3.2	Critério de seleção de indivíduos	26
4.3.3	Seleção e preparação das bactérias.....	27
4.3.4	Análise da concentração bacteriana por Citometria de Fluxo - FACS 27	
4.3.5	Cultivo e preparação de antígeno secretado semi-purificado bacteriano 28	
4.3.6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	29

4.3.7	Análise de reatividade antigênica por Western Blotting	29
4.3.8	Transferência eletroforética de proteínas do gel para o papel de NC 29	
4.3.9	Imunoblotting	30
4.4	RESULTADOS	31
4.4.1	Citometria de fluxo	31
4.4.2	Comparação dos métodos de crescimento bacteriano e análise quantitativa de <i>C. pseudotuberculosis</i>	33
4.4.3	Eletroforese.....	35
4.4.4	O perfil eletroforético do extrato de proteínas secretadas de três cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> em SDS-PAGE.	35
4.4.5	Imunoblotting	37
4.4.6	Imunorreatividade de indivíduos contactantes e não contactantes com a <i>C. pseudotuberculosis</i> à antígenos semi-purificados das cepas VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80.....	37
4.5	DISCUSSÃO	39
4.5.1	Análise comparativa da contagem e rendimento de crescimento bacteriano em diferentes tempos.....	39
4.5.2	Análise comparativa do perfil eletroforético dos extratos (SDS- PAGE) 41	
4.5.3	Análise comparativa do perfil de reconhecimento dos antígenos presentes nos extratos por soro humano (Western Blot).....	41
5	CONCLUSÃO	43
6	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A ovino-caprinocultura corresponde a importantes setores da atividade pecuária. No mercado internacional destaca-se fortemente a produção de lã, no entanto a produção de carne e leite, consistem em uma vital fonte de renda para diversas famílias do nordeste e de outras regiões brasileiras, assim como de vários países em desenvolvimento (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; PAPACHRISTOFOROU e MARKOU, 2006; BRASIL, 2006; VALERIO et al., 2009; BRASIL, 2015).

A maior parte da produção de caprinos e ovinos no Brasil é realizada geralmente em pequenos rebanhos criados em pecuária familiar. Isso se deve às características de baixos custos de produção, menor área de criação requerida e maior resistência a ambientes rigorosos, com escassez de comida e água, apresentada por esses rebanhos em comparação com grandes ruminantes (PAPACHRISTOFOROU e MARKOU, 2005; BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; EMBRAPA, 2007; MADRUGA e BRESSAN, 2011). Segundo Boyazoglu, Hatziminaoglou e Morand-Fehr (2005), o crescimento na criação de caprinos em países em desenvolvimento é um retrato positivo de um desenvolvimento socioeconômico, por ter um papel fundamental no sustento de famílias de baixa renda, as quais representam a maior parte dos produtores. O Brasil e a República Dominicana apresentam exemplos do papel social, econômico e cultural da criação de pequenos ruminantes em comunidades rurais de baixa renda, e da emancipação do indivíduo em situação de vulnerabilidade (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; EMBRAPA, 2007; VALERIO et al., 2009; NÓBREGA, 2010).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mais de 90% do efetivo de caprinos e 60% do efetivo de ovinos no Brasil está concentrado na região Nordeste, com destaque para os estados de Bahia e Pernambuco, estes rebanhos são destinados principalmente a produção de carne e couro (NÓBREGA, 2010; BRASIL, 2015). Os produtores da região Nordeste apresentam um índice de 70% de analfabetos, idade avançada, e um dos menores índices de orientação técnica (BRASIL, 2006). Estas características se assemelham ao observado na população da região Nordeste da República Dominicana (VALERIO

et al., 2009). Devido ao perfil socioeconômico dos produtores e baixo investimento no setor, a ovinocultura e caprinocultura apresentam problemas frequentes de manejo inadequado e dificuldades no controle de doenças (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; EMBRAPA, 2007; VALERIO et al., 2009).

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente patogênico responsável pela LC, um bacilo pleomórfico gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos (PASCUAL et al, 1995; VALE et al., 2003; IVANOVIĆ et al., 2009). Este bacilo apresenta dois possíveis biovars, biovar *equi*, causador de linfangite ulcerativa em eqüinos e bovinos, e biovar *ovis*, causador de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos (SONGER et al. 1988).

A alta frequência da Linfadenite Caseosa (LC) no território brasileiro deve-se à criação extensiva de pequenos ruminantes, à dificuldade do diagnóstico e erradicação da doença no rebanho e à falta de orientação adequada aos criadores de caprinos e ovinos, quanto à sanidade de seu rebanho (BRASIL, 2006; BRASIL, 2015). Importante fonte de renda na região Nordeste, a caprino-ovinicultura, é característica de pequenos produtores com idade avançada, baixa escolaridade e de baixo conhecimento técnico do setor, os quais obtêm o sustento de suas famílias pela venda da carne, pele e em menor proporção do leite (EMBRAPA, 2007). A elevada incidência desta doença nos rebanhos, apresenta um risco ocupacional aos profissionais do setor, cujo diagnóstico correto pode demorar anos (PEEL et al., 1997; JOIN-LAMBERT et al., 2006; HEGGELUND et al., 2015). Estes problemas exigem, cada vez mais, além de capacitação dos criadores, de métodos de diagnósticos precisos na detecção dessa doença em humanos, para facilitar o diagnóstico e acesso rápido ao tratamento de profissionais do setor de caprino-ovinicultura no Brasil. Apesar de existirem poucos registros de infecção em humanos mundialmente, a avaliação sorológica de indivíduos no Brasil que exercem atividade rural com pequenos ruminantes, apresentam reatividade aos antígenos de *C. pseudotuberculosis* diferente de indivíduos sem histórico de contato (SANTOS, 2018).

As técnicas de contagem bacteriana aplicadas em rotinas de laboratório apresentam diversas limitações de tempo e precisão (SAMPAIO, 2012). Técnicas como escala de Mc Farland e avaliação da Densidade Óptica, dependem da turbidez do meio e não permitem determinar a viabilidade celular (SANTIAGO, 2009). A

citometria de fluxo fornece uma técnica de alta sensibilidade para detecção e avaliação individual de células, que não demanda tratamentos complexos da amostra ou isolamento de alvo da mesma. Esta técnica é bem estabelecida nas ciências da saúde como método de diagnóstico para diversas doenças. A partir destes modelos, diversos protocolos para avaliação de contaminação, crescimento e características bacterianas têm sido desenvolvidos (BERGQUIST et al., 2009; GIVAN, 2010).

No presente estudo, foram avaliados o crescimento e viabilidade celular de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a produção de antígenos secretados semi-purificados das cepas estudadas e comparação do perfil de reconhecimento antigênico em amostras de indivíduos/humanos contactantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a Linfadenite Caseosa

Corynebacterium pseudotuberculosis, bacilo pleomórfico gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos causa a Linfadenite Caseosa (LC) que consiste de uma doença infecto-contagiosa crônica, caracterizada pela formação de granulomas em pequenos ruminantes principalmente (PASCUAL et al, 1995; VALE et al., 2003; IVANOVIĆ et al., 2009). *C. pseudotuberculosis* foi primeiramente descrita em bovinos por Nocard em 1885, sendo descrito por completo por Preisz em 1891 que identificou bactérias semelhantes em ovinos, apenas em 1948 este bacilo recebeu sua nomenclatura atual (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA, 2006). Este bacilo curto e irregular (0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm) pode se apresentar isolado ou formando agrupamentos irregulares ou em paliçada, comumente descrito com “letras chinesas” (FONTAINE, BAIRD, 2007). São bacilos imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos. A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* é dividida em duas variações biológicas (biovar) com base na capacidade ou não em reduzir nitrato a nitrito. O biovar *equi*, nitrato-positivo, que normalmente infecta eqüinos e bovinos, e biovar *ovis*, nitrato-negativo, que infecta caprinos e ovinos (SONGER et al. 1988).

C. pseudotuberculosis apresenta dificuldades de crescimento em meio básico, sendo possível suprir sua demanda nutricional com a adição de 10% de soro ou sangue de ruminantes (BENHAM, SEAMAN, WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002; FONTAINE, BAIRD, 2007). Após 48 horas de cultivo, observa-se uma β-hemólise em volta das colônias e a presença de um pigmento esbranquiçado nas colônias, caracteristicamente pequenas e circulares. Em meio sólido sem adição de sangue ou soro, as colônias apresentam coloração branco-acinzentada após 24 horas de incubação a 37°C. Após 48 horas, em ambos os meios as colônias possuem aspecto opaco, com uma protuberância arredondada no centro, de margem lisa ou ligeiramente irregular, de consistência friável e secas, sendo facilmente movidas pela superfície do ágar (BENHAM, SEAMAN, WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002; FONTAINE, BAIRD, 2007).

Em meio líquido, este bacilo forma uma frágil e fina camada na superfície do meio, apresentando coloração branco-acinzentada e sem aderir a parede do

recipiente de cultivo, enquanto o meio permanece translúcido sem turvação e com acúmulo de grumos provenientes da camada na superfície depositados ao fundo do recipiente. A agitação leva a ruptura da camada de crescimento bacteriano, porém não ocorre total dissociação do das paliças, tornando difícil a obtenção de uma suspensão homogênea e inviabilizando métodos tradicionais de contagem bacteriana (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006). Segundo Sampaio (2012), acrescentar 0,5% de Tween-80 ao meio de cultivo permite o segregado do microorganismo, permitindo realizar métodos de contagem bacteriana de forma mais adequada.

Agente infeccioso que acomete principalmente espécies de ruminantes, as principais doenças causadas por *C. pseudotuberculosis* são: linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, linfangite ulcerativa em equinos, abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório, artrites e bursites em ovinos, abscessos de peito em equinos e mais raramente em camelos, caprinos e cervos (PEPIN et al., 1994; KURIA, et al., 2001). Registros de infecção em humanos indicaram linfadenite subaguda e crônica, podendo ser contraída pelo contato direto com o microorganismo em laboratório, contato com animais infectados e em alguns casos sem identificação da fonte da infecção (PEEL et al., 1997).

A linfadenite caseosa (LC) é um dos principais obstáculos da ovino-caprinocultura, por afetar a produtividade do animal, estando presente em rebanhos de diversos países (EMBRAPA, 2007; IVANOVIĆ et al., 2009, SEYFFERT et al., 2010). A transmissão do *C. pseudotuberculosis* pode ocorrer por diversas vias, e de forma direta ou indireta, sendo a mais comumente referida a que ocorre através de contato com as lesões na pele do animal, oriundas do rompimento dos linfonodos, e liberação do agente nas estacas e meio ambiente (ELLIS et al., 1987; EMBRAPA, 2007; IVANOVIĆ et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010). O agente ao se alastrar para os pulmões, pode ser transmitido pela formação de aerossóis, os quais podem contaminar o ambiente ou a fonte de alimento e água do rebanho (ELLIS et al., 1987; RIBEIRO et al., 2001). Ao entrar no hospedeiro, a *C. pseudotuberculosis* instala-se nos linfonodos do animal, no qual desenvolve granulomas. Esta bactéria também pode ser transportada pela corrente sanguínea e desenvolver granulomas em diversos órgãos do hospedeiro como pulmões, fígado e rins (DORELLA et al., 2006; IVANOVIĆ et al., 2009).

Estudos com *C. pseudotuberculosis* ao longo dos anos levaram ao isolamento de diversas cepas em diferentes países, provenientes de infecções em diversas espécies. Isolada da lesão granulomatosa de um caprino no município de Juazeiro, Bahia, Brasil, a cepa VD57 foi identificada através da coloração de Gram, análise morfológica das colônias, hemólise em Ágar Sangue e ensaios bioquímicos utilizando o kit API Coryne (BioMérieux) (Moura-Costa, 2008). Isoladas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), foram identificados seguindo os mesmos critérios, e avaliados quanto a produção de biofilme dois isolados de caprinos, CAPJ4 - forte produtor de biofilme (CAP76) e CAP3W - negativa para produção de biofilme (CAP21) (SÁ et al., 2013; SÁ et al., 2013a; SÁ, 2018). A cepa PAT10, isolada de abscesso pulmonar de ovinos na província de Chubut na região Sul da Patagônia, Argentina (ESTEVAO-BELCHIOR, 2006). Estas diferentes cepas possuem seus genomas completamente sequenciados, VD57 GenBank com o número de acesso CP009927, CAP76 GenBank com o número de acesso CP026499 e CAP21 GenBank com o número de acesso CP026500, apresentando conservação de genes importantes apesar da diferença no grau virulência destas cepas (ALMEIDA et al., 2016; SÁ, 2018).

2.2 O diagnóstico clínico e laboratorial da LC

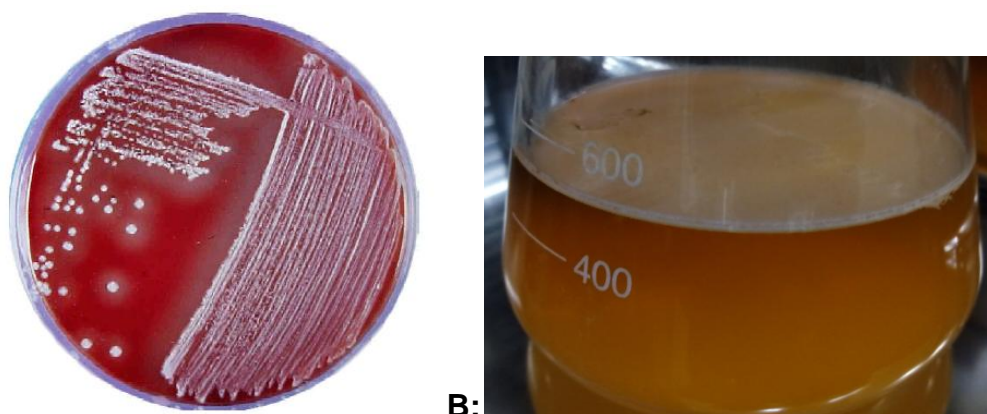
O contato com um agente biológico ou parte dele, gera um estímulo antigênico que induz atividade de células T e de células B. As células B diferenciadas são as principais responsáveis pela produção/secreção de anticorpos, com diferentes especificidades e afinidades frente a multiplicidade de epítopos (ABBAS,2001). A técnica de Western Blot permite realizar a avaliação da antigenicidade de biomoléculas, fornecendo dados importantes na prospecção de antígenos aplicáveis em imunodiagnóstico (SANTOS, 2018).

2.2.1 Diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais

A detecção da LC em rebanhos de caprinos e ovinos normalmente começa com achados clínicos, pela observação de linfonodos superficiais aumentados ou

exsudados, eliminação de material purulento de feridas superficiais na pele ou descargas oro-nasais nos casos de infecção nos pulmões e perda de peso (ELLIS et al., 1987; RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001). Com a avaliação clínica, os indivíduos que apresentaram sinais de infecção são isolados dos demais, para que estes não contaminem o restante do rebanho. Atualmente constitui diagnóstico padrão ouro para LC, o isolamento da bactéria diretamente do conteúdo caseoso, seguido por provas bioquímicas (RIBEIRO et al, 2001; WILLIAMSON, 2001; EMBRAPA, 2007). O cultivo bacteriológico exige pelo menos 48h para liberação dos resultados, adicionalmente há a necessidade de provas bioquímicas para confirmação microbiológica do agente, tempo consideravelmente longo em comparação a outras metodologias atuais já encontradas na literatura (EMBRAPA, 2007).

Figura 01: Cultura de *C. pseudotuberculosis* em meio Ágar sangue e em BHI Caldo.



A:

B:

Figura 1: **A** - Crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em placa de ágar sangue, as colônias com coloração branca e aspecto seco. Foto: Francisco Selmo Alves e Raymundo Rizaldo Pinheiro (EMBRAPA 2007). **B** - Crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio BHI caldo, com formação de película esbranquiçada e quebradiça, sem turbidez do meio. Foto: Caio Lopes Borges Andrade (Autoria própria).

Dentre as diversas técnicas aplicadas para diagnóstico indireto da infecção por *C. pseudotuberculosis*, destaca-se o uso de Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) como uma opção mais aplicada no diagnóstico com protocolos não comerciais ("in house"). Apesar dos primeiros ensaios desenvolvidos para detecção da LC terem apresentado especificidade e sensibilidade inferiores ao relatado por Laak et al. em 1992, modelos mais recentes, como o protocolo de ELISA indireto desenvolvido por Carminati *et al.* (2003), representam métodos de diagnóstico mais

consistentes (EMBRAPA, 2007). Na Holanda, a primeira identificação da Linfadenite Caseosa em ovinos foi descrita em 1978, a partir daí foram estabelecidos esforços para a erradicação da LC na Holanda (DERCKSEN et al., 2000). Procedimentos de ELISA foram estabelecidos e adaptados para realização de diagnóstico da LC, porém testes de reprodutibilidade dos protocolos estabelecidos revelaram sensibilidade e especificidade inferior ao relatado e a erradicação da Linfadenite Caseosa se tornou inviável por conta do considerável número de falsos negativos (DERCKSEN et al., 2000).

Testes com extratos secretados e somáticos de *C. pseudotuberculosis* também têm sido realizados através de técnicas de *Western blotting*. Os antígenos pesquisados foram extraídas do meio de cultivo bacteriano, do tratamento por ultrassom da bactéria, ou ainda de extratos a partir da bactéria tratada com solventes e detergentes (MEYER, 2000; PAULE et al., 2003; VALE et al., 2003; BASTOS, 2011; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

Em trabalho realizado pelo grupo do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, ovinos infectados experimentalmente se tem demonstrado reatividade sorológica por *Western blot* frente a proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* e semipurificadas pelo método de partição em três fases (three phase partitioning - TPP) (RIBEIRO, 2019).

Ellis e colaboradores (1991a), realizaram um estudo com soro de ovinos naturalmente infectados testando-o contra moléculas antigênicas de *C. pseudotuberculosis* extraídas de cultura submetida a ultrassom, e verificaram uma predominância de proteínas com pesos moleculares que variam de 20 KDa a 100 KDa. O grupo também observou que soros de ovinos imunizados experimentalmente reconheciam pelo menos oito antígenos entre 12 KDa a 79,4 KDa através do *Western blotting* (ELLIS et al., 1991b).

Os perfis de resposta em caprinos e ovinos da Bahia, com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção por *C. pseudotuberculosis*, foram descritos reconhecimentos de bandas proteicas no western blotting variando entre 21 KDa e 92 KDa nos grupos estudados com diferentes cepas desta bactéria oriunda de diferentes regiões (MEYER et al., 2002; VALE et al., 2003).

Ainda que os procedimentos de ELISA tenham sido melhorados (Carminati et al. 2003), estes são limitados seja pela janela imunológica do animal que podem

ainda gerar resultados falso negativos, por conta da limitada sensibilidade, seja pela falta de acesso a este teste nos diversos sistemas de rebanho, permitindo assim que animais infectados permaneçam junto ao rebanho sadio e impeçam finalmente a erradicação da LC em várias regiões e países. Adicionalmente, tendo em vista a dificuldade e imprecisão de procedimentos desenvolvidos anteriormente, e o aperfeiçoamento da detecção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Pacheco et al. (2007) estabeleceram um ensaio de PCR Multiplex e adaptaram um protocolo para extração de DNA da *C. pseudotuberculosis* diretamente de amostras clínicas.

Apesar de técnicas de PCR apresentarem alta sensibilidade, capacidade de detecção da infecção em período curto, e diferenciação entre indivíduos que foram expostos ao agente e indivíduos infectados, a rotina de ensaios de PCR ainda não é sustentável para a grande maioria dos laboratórios de análises clínicas (EMBRAPA, 2007; KUMAR, PARIDA, LAKSHMANA RAO, 2013). A difusão deste método ainda está distante de ser fácil e abrangente para as extensas áreas de criação do país.

2.2.2 Diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em humanos

Assim como em pequenos ruminantes, a infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos causa na principal manifestação clínica típica da linfadenite, apresentando inflamação dos gânglios linfáticos, afetando principalmente o linfonodo inguinal ou axilar. A infecção dos linfonodos apresenta inflamação granulomatosa necrotizante não específica, sem sinais de malignidade, além de vasculite não específica, sendo tratada por meio da remoção cirúrgica do gânglio infectado (PEEL et al., 1997). A infecção também pode ocorrer na forma visceral, acometendo pulmões levando a manifestação clínica como fadiga e tosse seca, apresentando difícil diagnóstico, sendo necessário a realização de biópsia, cultivo e provas bioquímicas para identificação do agente infeccioso (KESLIN et al., 1979).

O primeiro caso diagnosticado como infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos foi registrado em 1966 na cidade do Panamá (LOPEZ et al., 1966). A infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos apresenta quadro clínico similar ao da *Mycobacterium tuberculosis*, doença endêmica em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o que dificulta o diagnóstico no início da infecção

(HEGGELUND et al., 2015), pelos protocolos de avaliação clínica e os laboratoriais que precisam de métodos invasivos para obtenção de amostras do paciente. O diagnóstico em humanos descrito, é realizado com cultivo bacteriano a partir de amostras de lavagem brônquica ou biópsia do paciente, com os microrganismos cultivados identificados por meio de provas bioquímicas e confirmada a identidade do patógeno por meio de PCR e Sequenciamento Genômico (HEGGELUND et al., 2015). No Brasil não há descrição de casos da infecção em humanos, porém Santos (2018) registrou reatividade distinta entre soro humano de indivíduos contactantes e não-contactantes a antígenos secretados semi-purificados da cepa PAT10 de *C. pseudotuberculosis* por Western blot.

O estado da Bahia apresenta elevado índice de infecção humana por *Mtb*, com cerca de 27,5 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2017b; MATOS et al., 2007). A maioria das pessoas infectadas por *Mtb* evolui para a forma latente, sem apresentar sinais clínicos ou sintomas da doença (LIN; FLYNN, 2010).

Os gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* são filogeneticamente próximos (MCGUIRE et al., 2012), com quadro clínico similar de infecção de linfonodos e pulmões (MATOS et al., 2007; HEGGELUND et al., 2015), sendo possível detectar o contato prévio e forma latente da *Mtb* por Teste Cutâneo Tuberculínico (TCT) e/ou ensaio de liberação de interferon- γ (IGRA), ambos testes de diagnósticos para esta infecção (BRASIL, 2017b).

2.3 Contagem bacteriana

O crescimento bacteriano pode ser avaliado de diversas formas, sendo as metodologias mais aplicadas, avaliação da Densidade Óptica e escala de Mc Farland, baseadas na avaliação da turbidez do meio de cultivo no espectro de 600 nm. Essas metodologias permitem realizar o acompanhamento da curva de crescimento bacteriano e o número de bactérias aproximado (TORTORA, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de avaliar características de estruturas microscópicas, registradas como eventos, como células e beads em uma suspensão que ao ser adquirida pelo aparelho, atravessa uma câmara onde ocorre a passagem célula a célula, na qual o feixe de radiação perpendicular ao fluxo incide na estrutura e passa por filtros ópticos para detecção da difração e comprimentos de

onda, os sinais são convertidos por um Conversor Análogo para Digital (ADC) e processados em um computador (SILVA, et al. 2005; GIVAN, 2010)

A contagem bacteriana total por citometria de fluxo, utiliza da adição de corantes fluorescentes que intercalam com ácidos nucleicos, permitindo ao aparelho discriminar os eventos que correspondem a células bacterianas e diferenciar dentre estas, células vivas e mortas (GUNASEKERA, ATTFIELD, VEAL, 2000; HAMMES et al. 2008; SAMPAIO, 2012; BUZATO, et al. 2014).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o cultivo de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos tempos 24, 48 e 72 horas e produzir extratos secretados semi-purificados para caracterizar o perfil de reconhecimento destes antígenos com soro humano.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o crescimento e viabilidade celular da cepa VD57 de *C. pseudotuberculosis* ao longo de 72h de cultivo.

Comparar o crescimento e viabilidade celular de cepas VD57, CAP21 e CAP76 de *C. pseudotuberculosis* ao longo de 48h de cultivo.

Produzir extrato de proteínas secretadas semi-purificadas das respectivas cepas com 48 horas de cultivo, para avaliação da sororreatividade humana.

Caracterizar o perfil eletroforético de proteínas secretadas semi-purificadas dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em SDS-PAGE.

Avaliar a sororreatividade humana aos antígenos secretadas semi-purificadas dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Western Blot.

4 CAPÍTULO I: Contagem bacteriana e produção de antígenos secretados de diferentes cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Caio L. B. Andrade^{1,5}, Ramon M. dos Santos^{1,6}, Silvânia M. A. Cerqueira^{1,3,6}, Luiz G. F. Oliveira¹, Gabriel S. Müller¹, Marcos B. Ribeiro^{1,6}, Rogério R. Conceição^{1,6}, Samanta Queiroz^{1,6}, Silvana Marchioro¹, Fúlvica S. C. de Sousa², Allan Souza¹, Mariane Melo¹, Alex Torres^{1,6}, José T. R. Filho¹, Maria C. A. Sá^{1,6}, Lília Moura-Costa^{2,5}, Eduardo M. Netto^{4,6}, Roberto J. Meyer^{1,6}, Songeli Menezes Freire^{1,5,6}.

¹ Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.

² Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) - ICS - UFBA, Brasil.

³ Hospital Especializado Otávio Mangabeira, Bahia - Brasil.

⁴ Laboratório de Pesquisa em Infectologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Salvador, Bahia - Brasil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) - ICS - UFBA, Brasil.

⁶ Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) - ICS - UFBA, Brasil.

4.1 RESUMO

Introdução: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável pela Linfadenite Caseosa (LC) que é uma doença infecto-contagiosa que compromete economicamente a pecuária. A infecção em humano ocorre pelo manejo de animais, consumo de seus derivados crus ou em laboratórios, com poucos casos descritos e apenas um estudo no Brasil. A identificação bacteriana proveniente do conteúdo caseoso, seguido por testes bioquímicos constitui atualmente o teste padrão ouro de diagnóstico. **Objetivo:** O presente trabalho se propõe a avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos para avaliação da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Métodos:** Para contagem bacteriana e estudo da viabilidade celular em FACSCalibur (BD) foram realizados cultivos da cepa VD57 para os três tempos (24, 48, 72 horas) e comparação com cepas CAP3W(21) e CAPJ4(76) em 24 e 48 horas. Para produção do antígeno, foi utilizado o sobrenadante do cultivo com 48 horas das cepas VD57, CAP3W(21) e CAPJ4(76), semi-purificados por técnica de partição em três fases (TPP). Foi produzido extrato em meio com e sem Tween somente para cepa CAPJ4(76). O perfil eletroforético dos quatro extratos foi analisado por SDS-PAGE em gel 12% e a sororreatividade avaliada em Western Blot com *pool* de amostras séricas do grupo Não Contactante (composto por 4 participantes sem histórico de contato com a bactéria ou consumo de carne crua ou mal cozida), grupo Contactante laboratório (composto por 4 indivíduos com histórico de contato por atividade em laboratório de microbiologia) e grupo Contactante fazenda (composto por 4 indivíduos com histórico de contato com animais infectados). **Resultado:** Na avaliação por FACs, evidenciou-se crescimento celular mais acelerado para cepa VD57 com resultado 10 vezes superior ao registrado por CAP3W(21) e CAPJ4(76). O ápice da viabilidade celular registrado foi de 48 horas, porém não foi identificada variação considerável da mortalidade celular com 72 horas. O perfil eletroforético dos extratos produzidos revelou diferenças na expressão de proteínas entre as três cepas, bem como para cultivos em condições diferentes para CAPJ4(76). Foi registrada intensa sororreatividade humana aos quatro extratos, confirmando a presença de proteínas antigênicas em todas as cepas, porém foi possível identificar

diferença no perfil de reconhecimento entre os grupos Contactantes e Não Contactantes apenas no extrato VD57. **Conclusão:** A cepa VD57 apresenta ápice do crescimento e viabilidade no tempo de 48 horas de cultivo e na comparação entre as três cepas, demonstra crescimento e viabilidade superiores ao das demais. O perfil eletroforético dos extratos de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e diferença no peso molecular. A utilização de Tween-80 no meio de cultivo, gera um acréscimo de 50% no número de bandas para CAPJ4(76). Todos os extratos produzidos apresentam antigenicidade para soro humano, porém é possível evidenciar diferença no perfil de Contactantes do perfil de Não Contactantes apenas em VD57.

Palavras chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Contagem Bacteriana; Sororreatividade Humana

4.2 INTRODUÇÃO

A ovino-caprinocultura correspondem a importantes setores da atividade pecuária. No mercado internacional destaca-se fortemente a produção de lã, no entanto a produção de carne e leite, consistem em uma vital fonte de renda para diversas famílias do nordeste e de outras regiões brasileiras, assim como de vários países em desenvolvimento (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; PAPACHRISTOFOROU e MARKOU, 2006; BRASIL, 2006; VALERIO et al., 2009; BRASIL, 2015).

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente patogênico responsável pela LC, um bacilo pleomórfico gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos (PASCUAL et al, 1995; VALE et al., 2003; IVANOVIĆ et al., 2009). Identificada pela primeira vez em ovinos por Preisz em 1891 e descrita como causadora da Linfadenite Caseosa, *C. pseudotuberculosis* passou a ter sua nomenclatura atual em 1948 (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA, 2006). Este bacilo apresenta dois possíveis biovar, biovar equi, causador de linfangite ulcerativa em eqüinos e bovinos, e biovar ovis, causador de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos (SONGER et al. 1988).

O primeiro caso diagnosticado como infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos foi registrado em 1966 na cidade do Panamá (LOPEZ et al., 1966). A infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos apresenta quadro clínico similar ao da *Mycobacterium tuberculosis*, doença endêmica em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o que dificulta o diagnóstico no início da infecção

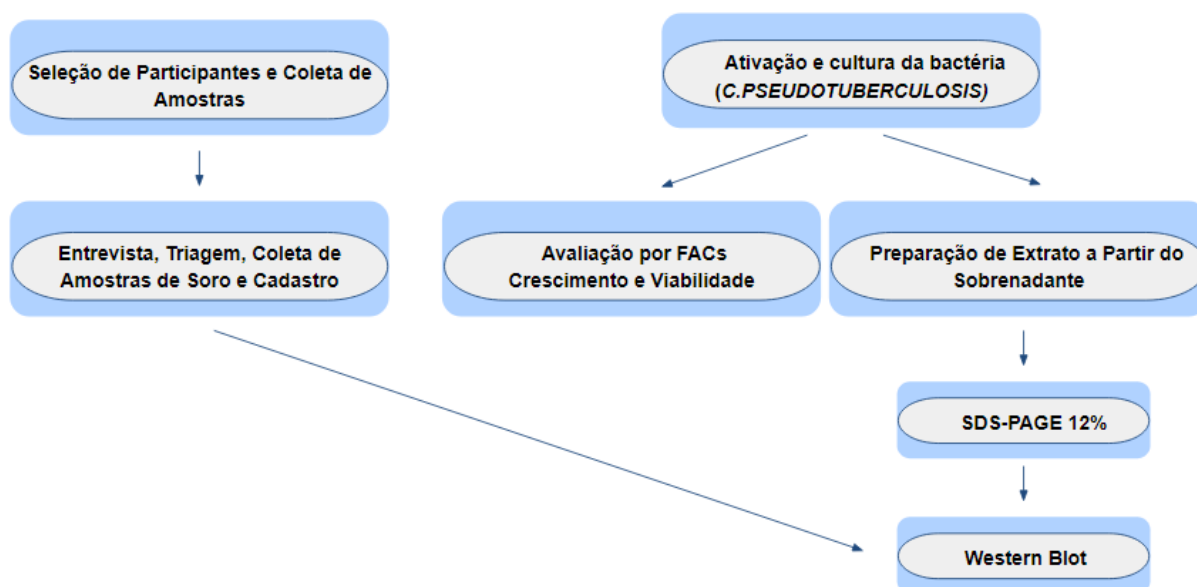
(HEGGELUND et al., 2015). O diagnóstico em humanos descrito, foi realizado com cultivo bacteriano a partir de amostras de lavagem brônquica ou biópsia do paciente, com os microrganismos cultivados identificados por meio de provas bioquímicas e confirmada a identidade do patógeno por meio de PCR e Sequenciamento Genômico (HEGGELUND et al., 2015).

A citometria de fluxo fornece uma técnica de alta sensibilidade para detecção e avaliação individual de células, que não demanda tratamentos complexos da amostra ou isolamento de alvo da mesma. Esta técnica é bem estabelecida nas ciências da saúde como método de diagnóstico para diversas doenças. A partir destes modelos, diversos protocolos para avaliação de contaminação, crescimento e características bacterianas têm sido desenvolvidos (BERGQUIST et al., 2009; GIVAN, 2010).

O presente trabalho tem a finalidade de avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos e análise da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 02: Fluxograma da metodologia.



4.3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA), com CAAE: 57018116.9.0000.5662. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a entrevista clínico-epidemiológica.

4.3.2 Critério de seleção de indivíduos

Aos participantes da pesquisa foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e com o aceite os voluntários foram entrevistados, n = 12. Foram realizados testes para confirmar o não contato dos participantes com antígenos de *Mtb*, os quais podem apresentar reatividade cruzada com os de *C. pseudotuberculosis* devido a sua proximidade filogenética. Após o teste cutâneo tuberculínico e o teste IGRA, todos os resultados foram entregues aos participantes pela pesquisadora farmacêutica bioquímica, responsável técnica e o especialista infectologista do grupo encontrava-se disponível para eventuais consultas pelos participantes, nos dias e horários para atendimento previsto no ambulatório especializado em doenças infecciosas do Complexo Hospitalar Universitário.

O Teste Cutâneo Tuberculínico utilizado foi o Derivado Proteico Purificado de *Mtb* TCT/PPD - (Statens, Dinamarca) para investigar o possível contato com *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA. Foram coletadas amostras de sangue para o teste IGRA (QTF-TBGold), para diagnóstico *in vitro* de infecção pelo *Mtb* (conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA Brasil para IGRA QTF) e para obtenção de soro. Após coleta e separação do sangue, as alíquotas de soro e plasma foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. Assim foram selecionadas as amostras de voluntários que apresentaram resultados negativos nos testes de contato com *Mtb*.

Os participantes foram categorizados nos grupos Contactantes (trabalhadores de fazenda com pequenos ruminantes ou estudantes de laboratório de microbiologia com contato com o bacilo) e Não Contactantes (sem contato com caprinos e ovinos ou seus derivados alimentícios crus ou com o bacilo) todos com resultado TCT <5mm (negativo) e IGRA negativo. O presente trabalho fez uso de uma fração dos

soros obtidos por SANTOS (2018) e previamente testados para o reconhecimento de antígenos secretados da cepa PAT10, cepa proveniente da região da Patagônia na Argentina, sendo a seleção de quatro soros do grupo Não Contactante e oito soros do grupo Contactante (quatro de fazenda e quatro de laboratório), realizada de forma aleatória com auxílio de aplicativo de sorteio. A metodologia seguiu como ilustrado no fluxograma da Figura 2.

4.3.3 Seleção e preparação das bactérias

As cepas VD57, CAP21 (não forma biofilme) e CAP76 (formadora de biofilme) de *C. pseudotuberculosis* identificadas como de interesse, entre as disponíveis na coleção da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – Universidade Federal da Bahia (UFBA), foram ativadas para uso nas análises de crescimento e produção de antígenos. As cepas foram previamente avaliadas com testes de identificação e caracterização bioquímica laboratorial e coloração de Gram, após ativação do banco de amostras preservadas a -20 °C. As três cepas são caracterizadas por kit API-Coryne (BioMérieux) e sequenciadas, VD57 GenBank com o número de acesso CP009927, CAP76 GenBank com o número de acesso CP026499 e CAP21 GenBank com o número de acesso CP026500 (ALMEIDA et al., 2016; SÁ, 2018)

4.3.4 Análise da concentração bacteriana por Citometria de Fluxo - FACS

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 °C por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada descartável (10 µL), uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 °C por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500 µL foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo com 0,5% de TWEEN-80, a 37°C com agitação de 120 rpm, por 72 horas para VD57 (cepa definida como padrão para avaliação) e 48 horas para CAP21 e CAP76 (EMBRAPA 2007; SAMPAIO 2012). Das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nos tempos 24, 48 e 72 horas de cultura, amostras de 100 µL foram retirados e diluídos em 900 µL de PBS-TWEEN-80 0,5%, e homogeneizadas. Desse volume, 50 µL foram transferidos para tubos BD TruCount™ contendo 450 µL de PBS-T 0,5%. A esses tubos foram

então adicionados 5 µL (diluído em água a concentração final de 1:2) do corante Diamond™ Nucleic Acid Dye (10.000x, PROMEGA), após homogeneizado e incubado por 20 minutos sob proteção da luz e à temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de Iodeto de propídio (solução 0,25 mg/mL). Finalmente homogeneizada a suspensão, foi procedida a aquisição pelo citômetro de fluxo para mensuração, com algumas modificações a partir de Sampaio (2012). As aquisições nos tempos previstos foram realizadas em quadruplicata para VD57 e em duplicata para as cepas CAP21 e CAP76. Foi determinada aquisição de 400.000 eventos por tubo, com velocidade de aquisição entre 2.000 e 3.000 eventos por segundo. A aquisição foi realizada com o programa BD CellQuest™ Pro e os valores obtidos foram analisados em Microsoft Office Excel. A fórmula para cálculo do número de células por microlitro foi, N° de eventos bactérias \times N° de beads adquiridas / N° de beads do tubo \times Volume do teste em µL, seguindo protocolo do kit BD TruCount™.

4.3.5 Cultivo e preparação de antígeno secretado semi-purificado bacteriano

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 °C por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada, uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 °C por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500 µL foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo a 37°C por 48 horas (EMBRAPA 2007; SÁ 2018; SANTOS 2018). Para a cepa CAP76, foi realizada uma segunda expansão com mesmas condições exceto pela adição de 0,5% de TWEEN-80 ao meio e crescimento em agitação de 120 rpm (SAMPAIO, 2012).

Para separação da massa úmida bacteriana e do meio de cultura contendo antígenos secretados foi realizada centrifugação em tubo Falcon de 50 mL, a 6.000 xG, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para semi-purificação de proteínas secretadas utilizando o método de partição em três fases (Three Phase Partitioning - TPP), o qual foi filtrado a vácuo com um filtro bacteriológico de Nitrocelulose 0,22 µm (BioRad). Foram adicionados 176 g/L de Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄) ao sobrenadante obtido e ajustado para pH 4.0 com HCl. Em uma garrafa de 1 L foi adicionado 250 mL do sobrenadante contendo Sulfato de Amônio e 250 mL de N-butanol (C₄H₁₀O), homogeneizado com vigorosa agitação manual por 10 minutos. Após repouso, a interface contendo as moléculas de interesse foi

cuidadosamente coletada com uma pipeta graduada e transferida para um tubo Falcon de 50 mL, após retirar o excesso de Butanol e BHI do tubo, foi adicionado Tampão Fosfato de Sódio (TFS) 0,01M pH 7.3 até atingir o volume final de 5 mL. Por fim, esse extrato semi-purificado obtido de cada cepa foi dialisado (membrana cut-off 10 KDa - SIGMA) com 4 trocas de TFS (PAULE et al., 2004).

A concentração de proteínas do extrato de cada cepa foi dosada pelo método de Lowry (BioRad), obtendo 1,46 mg/mL (VD57), 0,914 mg/mL (CAP21), 2,67 mg/mL (CAP76 c/T) e 2,79 mg/mL (CAP76 s/T), sendo armazenados em alíquotas de 400 µL a -20 °C.

4.3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE dos antígenos das três cepas foi realizado segundo metodologia padronizada previamente por Paule e colaboradores (2003), utilizando gel de migração com 12% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% SDS, 0,75% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED (tetrametiletilenodiamina) em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; e gel de empilhamento com 4% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% de SDS, 0,4% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED e tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

As aplicações nos géis foram realizadas com ajuste para 12 µg de extrato proteico por poço do gel considerando concentração de cada extrato obtido. Em um poço foi aplicado 1,5 µL do padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 KDa (Thermo Scientific™). A migração ocorreu sob corrente elétrica de 30 mA e voltagem livre (para dois géis).

Para revelação das proteínas em gel foi utilizado o método de coloração por Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad). A análise do gel corado foi realizada com o programa GelAnalyzer2010.

4.3.7 Análise de reatividade antigênica por Western Blotting

4.3.8 Transferência eletroforética de proteínas do gel para o papel de NC

Após a eletroforese contendo 79,2 µg de extrato proteico de cada cepa em um poço de 3,3 cm o "sandwich" foi montado em uma bandeja contendo o tampão de transferência para manter todas as camadas umedecidas, seguindo a sequência

organizacional colocando-se a esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulose (BioRad) de 0,22 μm de porosidade, gel contendo as proteínas, papel filtro e esponja, as bolhas entre as camadas foram removidas, o cassete foi fechado e o procedimento repetido para o segundo gel. Cada cassete foi então colocado no Kit Mini-Protean (BioRad), imerso em tampão de transferência. A fonte (BioRad) foi ligada com voltagem fixa de 100 V. A cuba de acrílico foi mantida dentro de recipiente com gelo para evitar superaquecimento. Após uma hora o sistema foi desligado e desmontado, o papel de nitrocelulose foi então identificado para a orientação dos lados e posição da corrida. Posteriormente o papel de nitrocelulose foi corado com Ponceau S para confirmação da transferência, descorado e cortado em fitas.

4.3.9 Imunoblotting

Cada fita contendo o extrato proteico da *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi devidamente posicionada e colocada em tubos pré-rotulados e lavados com PBS. Após as lavagens os tubos foram imersos em solução de bloqueio contendo tampão salina 0,15M com fosfato 0,01M (pH 7,2-7,4) contendo 0,05 % de Tween-20, 5% de leite desnatado e submetidos a agitação mecânica overnight a 4°C. Após o bloqueio cada fita foi lavada com PBS-Tween 0,5% e posterior incubação com o pool de soro dos participantes sob agitação a 37°C por 1h. As fitas foram lavadas quatro vezes e incubadas com conjugado anti-IgG humana (Life technologies) sob agitação a 37°C por 1h. Após cinco lavagens com PBS-Tween as fitas foram imersas em solução reveladora, 0,024g de 4-Cloro- α -Naftol (Sigma), 8 mL de metanol, 32 mL de PBS e 13,3uL de H₂O₂, sob agitação por 20 - 30 min. A revelação foi interrompida com lavagem em água destilada.

O padrão de migração eletroforética das bandas transferidas e identificadas pela reação Ag-Ac foi calculado a partir do PM relativo calculado no GelAnalyzer2010, superposto ao padrão do gel considerando as distâncias individuais de cada banda identificada. Foi analisado o padrão de bandas identificadas no gel e nas fitas após reação com soro de cada grupo estudado. Os dados encontrados foram tabelados e os resultados comparados entre os quatro extratos. Procedeu-se uma busca por similaridade entre os resultados obtidos no presente estudo e peso molecular de bandas reativas descritas em trabalhos prévios

realizados com *C. pseudotuberculosis* nos preparados similares e que reagiram nos modelos de infecção humana (SANTOS, 2018) e infecção natural e experimental de ovino e caprino (MEYER, 2000; VALE et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2013; Sá, 2018; RIBEIRO, 2019).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Citometria de fluxo

Da aquisição das amostras de suspensão bacteriana, nos dados obtidos por FACs, foi estabelecida uma máscara com dois gráficos para avaliação dos eventos totais adquiridos (Figura 03). O gráfico representativo A (Figura 03-A) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise de tamanho no eixo X (FSC) e complexidade interna no eixo Y (SSC), na qual foram estabelecidas quatro regiões (R1; R2). Em R1 foram identificados na maior parte eventos correspondendo a células bacterianas. Em R2 encontra-se a população de beads provenientes do tubo BD-TruCount. Foi evidenciada a concentração de eventos que não correspondiam a células ou beads, sendo considerados artefatos, com maior concentração da população abaixo do ponto 10^1 do eixo Y. O gráfico representativo B (Figura 03-B) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise da fluorescência identificada pelo aparelho e avaliada no gráfico do canal FL1, leitura no espectro verde no qual identifica-se o corante Diamond™, no eixo X e do canal FL2, leitura no espectro vermelho no qual identifica-se o corante Iodeto de propídio, no eixo Y. O gráfico B é dividido em quatro quadrantes, para diferenciação entre população duplo negativa (Low/Left - LL), fluorescência no espectro verde (Low/Right - LR), fluorescência no espectro vermelho (Up/Right - UL) e fluorescência em ambos espectros (Up/Right - UR). Sendo assim, LL representa ausência de corantes e foi considerado como artefatos da leitura, LR representa presença apenas do corante Diamond™ e foi considerado como células bacterianas viáveis íntegras, UL representa presença apenas do corante Iodeto de propídio e foi considerada como células bacterianas mortas, e UR representa a presença de ambos os corantes e foi considerado como células bacterianas danificadas (com perda da integridade da membrana plasmática). As

beads apresentam fluorescências com comprimento de onda específico dos canais FL-1 e FL-2 e foram subtraídas para o cálculo de número de células danificadas.

Figura 03: Parâmetros estabelecidos na Contagem bacteriana por FACs.

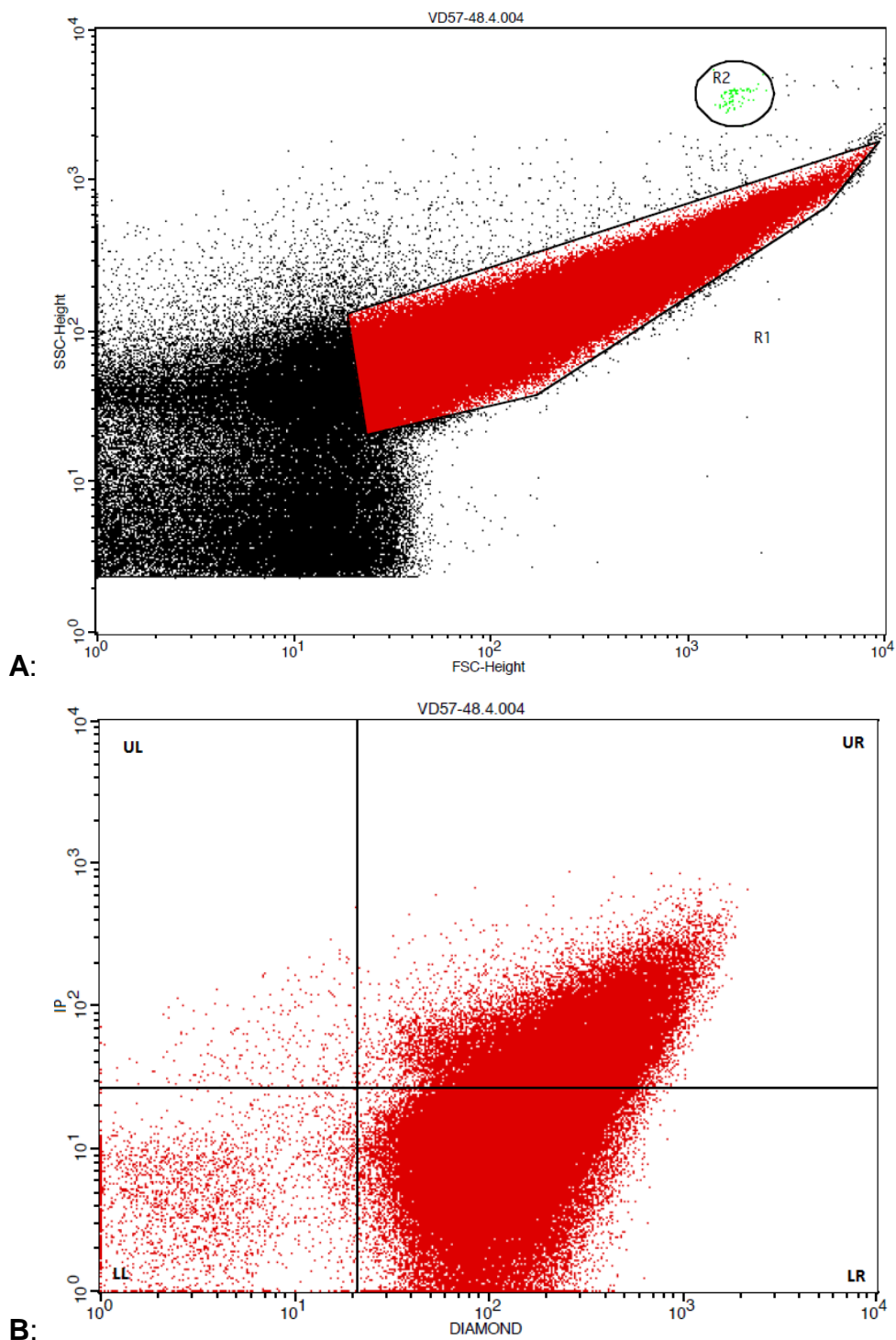


Figura 3: **A** – Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount, em gráfico de Tamanho x Complexidade interna (FSC x SSC), com delimitação de Gates R1 (população bacteriana) e R2 (população de beads). **B** – Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount™, em gráfico de intensidade de

fluorescência Diamond™ x Iodeto de propídio (DIAMOND x IP), com divisão por quadrantes LL (duplo negativo), LR (Diamond™ positivo), UL (IP positivo) e UR (duplo positivo).

4.4.2 Comparação dos métodos de crescimento bacteriano e análise quantitativa de *C. pseudotuberculosis*

No Quadro 01 (cepa VD57), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e bactérias mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de 1×10^6 bac/ μ L em 24hs, 2×10^7 bac/ μ L em 48 horas e 4×10^5 bac/ μ L em 72hs. Entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 31% em 24hs, 72% em 48hs e 35% em 72hs. A taxa de células com dano foi cerca de 57% no início e no final da incubação da curva de crescimento com cerca de 27% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos, cerca de 11% com 24hs e que diminui no decorrer das 48 e 72 horas para 0,7% e 2%, respectivamente.

A cepa CAP21, descrita como não formadora de biofilme (SÁ, 2017) pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de $7,9 \times 10^6$ bac/ μ L em 24hs, $1,4 \times 10^6$ bac/ μ L em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 58% em 24hs, 68% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 40% em 24hs e cerca de 30% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1,6% nas 24hs e que diminui no decorrer das 48 horas para 0,7% (Quadro 01).

A cepa CAP76, descrita como formadora de biofilme (SÁ, 2017), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis

íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 °C no período de 24 e 48hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de 5×10^5 bac/ μ L em 24hs e 7×10^5 bac/ μ L em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 91% em 24hs e 83% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 7% em 24hs e cerca de 15% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1% nas 24hs e que diminui no decorrer das 48 horas para 0,3% (Quadro 01).

No Gráfico 01 (A), células vivas íntegras, é possível observar o crescimento da cepa VD57 com ápice no tempo de 48 horas. A variação da porcentagem de células vivas íntegras para CAP21 e CAP76 foi menor que 10%, sendo evidenciado queda na viabilidade com 48h em CAP76. Em (B), células danificadas, é possível identificar relação inversamente proporcional ao apresentado em (A). O Gráfico 01 (C), células mortas, demonstra resultados baixos de porcentagem de células mortas para todas as cepas, apresentando apenas em 24 horas para VD57 valor superior a 5% de células mortas.

Quadro 01: Análise da contagem e viabilidade celular

A				B			
Amostra	Celulas vivas totais / μ L	Celulas danificadas totais / μ L	Celulas mortas totais / μ L	Amostra	% de células vivas contadas	% de células danificadas contadas	% de células mortas contadas
VD57 24h	11950,25	21943,24	4405,40	VD57 24h	31,37	57,06	11,56
VD57 48h	181147,02	67924,21	1626,35	VD57 48h	72,51	26,83	0,66
VD57 72h	25588,11	51153,88	1725,52	VD57 72h	34,75	63,11	2,14
CAP21 24h	79886,16	54823,54	2167,37	CAP21 24h	59,00	39,41	1,59
CAP21 48h	14055,34	6214,95	134,86	CAP21 48h	68,88	30,44	0,68
CAP76 24h	5507,00	437,25	69,26	CAP76 24h	91,56	7,28	1,16
CAP76 48h	7054,57	1286,67	25,06	CAP76 48h	84,24	15,46	0,30

Quadro 01: (A) Médias do número de células vivas íntegras, danificadas e mortas totais por microlitro de cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo. (B) Média da porcentagem de células vivas íntegras, danificadas e mortas da cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo.

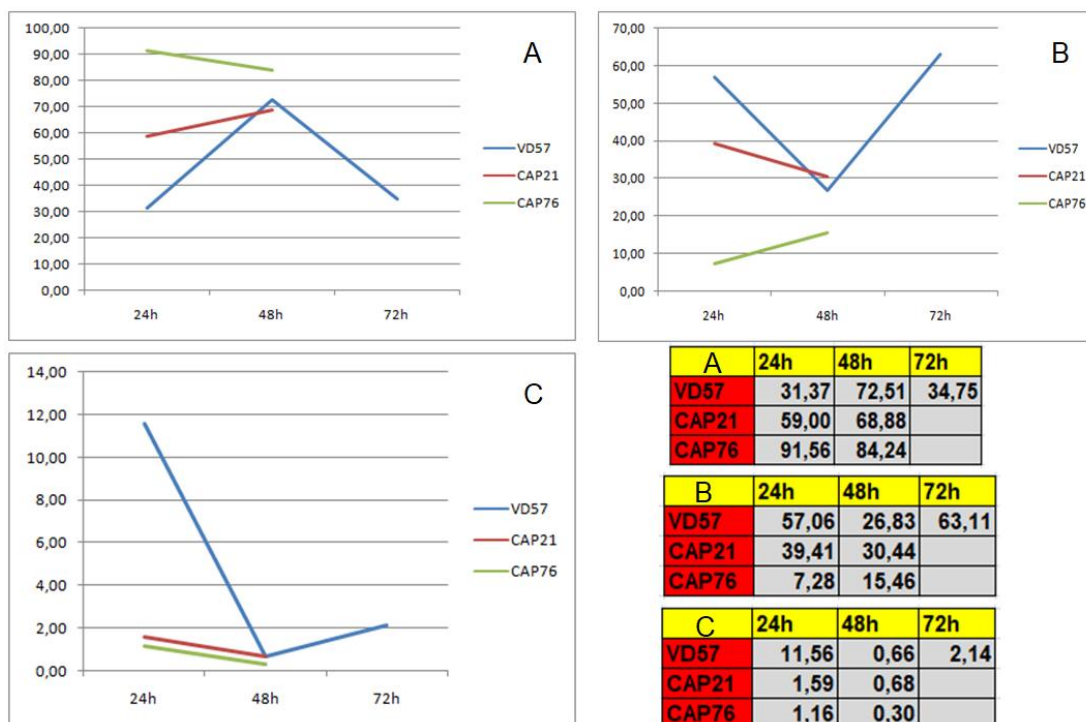
Gráfico 01: Variação da viabilidade celular de cepas de *C. pseudotuberculosis*

Gráfico 01: (A) Gráfico da média da variação de células viáveis integras em porcentagem x tempo. (B) Gráfico da média da variação de células danificadas em porcentagem x tempo. (C) Gráfico da média da variação de células mortas em porcentagem x tempo.

4.4.3 Eletroforese

4.4.4 O perfil eletroforético do extrato de proteínas secretadas de três cepas de *C. pseudotuberculosis* em SDS-PAGE.

Com a análise da eletroforese do extrato proteico das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween80) em SDS-PAGE 12% corado pelo método de Coomassie blue, utilizando o programa GelAnalyzer2010, foi possível observar a presença de bandas com pesos moleculares que variam de 16 KDa a 213 KDa (Figura 4 a e b).

O extrato proteico da cepa VD57 possui 17 bandas entre 16 KDa e 167 KDa, CAP21 possui 19 bandas entre 16 e 168 KDa, CAP76 cultivada com Tween80 possui 27 bandas entre 16 e 213 KDa e, CAP76 cultivada sem Tween80 possui 15 bandas entre 16 e 170 KDa (Figura 4c-1h).

Os pesos moleculares das bandas reveladas em cada cepa estão descritas na figura 04 e, f, g e h. Destacam-se pela presença nas três cepas estudadas sem Tween80 as bandas de ~16, ~17, ~20, ~22, ~24, ~27, ~31, ~33, ~38, ~42, ~46, ~52,

~54, ~58, ~60, ~63, ~70, ~75, ~81, ~89, ~96, ~102, ~115, ~121, ~131, ~146, ~151, ~158, ~161, ~169, ~185 e ~213 KDa (a variação de um ponto acima ou abaixo está representando aqui com o símbolo ~).

Das bandas identificadas no gel SDS-PAGE 12% eram comuns nas três cepas, as de 169, 102, 75, 70, 31, 24, 16 KDa e entre as preparações semipurificadas de CAP76 com e sem tween observadas encontravam-se as de 169, 161, 131, 102, 75, 70, 38, 31, 27, 24, 16 KDa.

Figura 04: Perfil eletroforético dos extratos semipurificadas de cepas cultivadas de *C. pseudotuberculosis*.

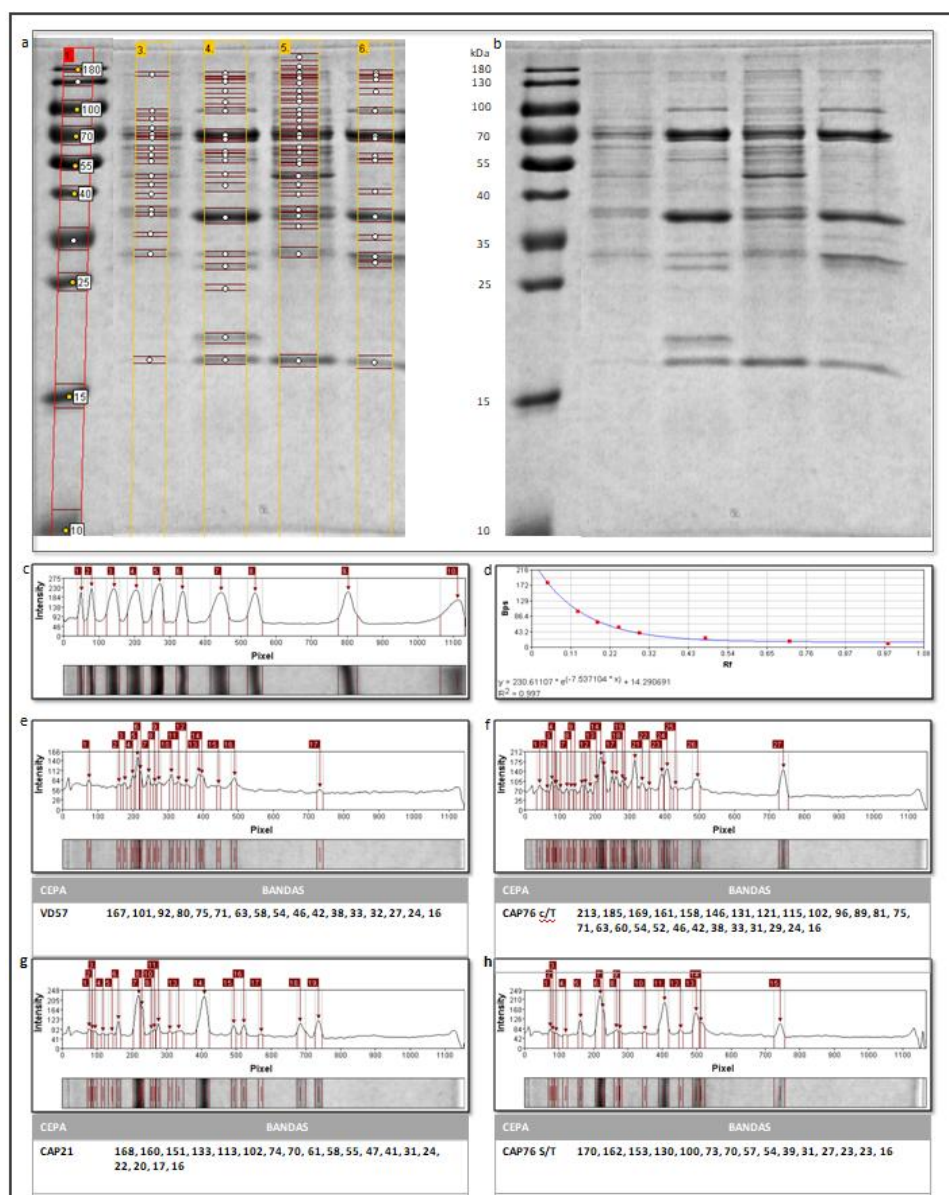


Figura 04: Análise de eletroforese de extratos semipurificadas de *C. pseudotuberculosis* crescida em caldo BHI por 48em gel SDS-PAGE de 12% corado com Coomassie Blue em GelAnalyzer2010. (a) Perfil de bandas reveladas no Gel – **coluna 1:** PM 10-180KDa -Thermo

Scientific™, **coluna 3:** extrato VD57, **coluna 4:** CAP21, **coluna 5:** CAP76 c/Tween, **coluna 6:** CAP76 s/Tween-80 ; (b) Identificação as banda do PM e dos extratos no GelAnalyzer ; (c) Análise do perfil eletroforético do padrão de peso molecular PM (10 a 180KD – Thermo Scientific™); (d) Curva de calibração para o cálculo do peso molecular; (e- h) Determinação do PM das bandas identificadas nos quatro extratos, na ordem descrita nos respectivos quadros identificados.

Quadro 02: Relação de bandas proteicas presentes de PM coincidentes no gel de eletroforese SDS-PAGE 12%

Extrato proteico	213	185	169	161	158	151	146	131	121	115	102	96	89	81	75	70	63	60	58	54	52	46	42	38	33	31	27	24	22	20	17	16		
VD57			X								X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X					X	
CAP21			X	X		X		X		X	X				X	X		X	X	X		X	X			X		X	X	X	X	X	X	
CAP 76 c/T	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
CAP 76 s/T			X	X		X		X			X				X	X			X					X		X	X	X	X					X

4.4.5 Imunoblotting

4.4.6 Imunorreatividade de indivíduos contactantes e não contactantes com a *C. pseudotuberculosis* à antígenos semi-purificados das cepas VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80.

Na figura 05 e quadro 03 observa-se reconhecimento pela reatividade IgG com as bandas identificadas nas amostras séricas de pool de indivíduos dos grupos contactante com a *C. pseudotuberculosis* em laboratório, fazenda e também no grupo de indivíduos que relataram não contato com a bactéria ou lida com pequenos ruminantes (não contactante).

No extrato VD57 foi reconhecida a banda de aproximadamente 151 KDa, e no CAP21 a banda de aproximadamente 135 KDa, ambas exclusivas para as respectivas cepas (Quadro 03).

Os diferentes extratos apresentaram reatividade da banda de 89 KDa no grupo não contactante, e apenas na VD57 ela aparece nos três grupos.

A banda de 68 KDa foi reconhecida em todos os extratos no grupo de contato laboratório. Em VD57, CAP21 e CAP76 S/Tween apresentaram a referida banda para o grupo contactante em fazenda, apenas nos extratos CAP21 e CAP76 S/Tween no grupo não contactante (Quadro 03).

Todos os extratos apresentaram a banda de 64 KDa, exceto no grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 S/Tween.

Em todos os extratos a banda de aproximadamente 42 KDa apresentou reatividade, com exceção do grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 sem Tween.

Os extratos CAP21 e CAP76 cultivada com Tween80 apresentaram a banda de aproximadamente 38 e 36 KDa em todos os grupos. O extrato CAP76 sem Tween apresentou apenas a banda de 38 KDa nos grupos contactante em laboratório e não contactante. Não foram detectadas as referidas bandas no VD57.

Apenas o extrato CAP21 apresentou a banda de aproximadamente 25 KDa, contudo é possível observar uma possível banda desta altura no CAP76 sem Tween no grupo contactante em laboratório. Apenas no de CAP76 cultivada com Tween80 apresentou uma banda na altura de 18 KDa, no grupo contactante em laboratório.

Figura 05: Western blot dos antígenos de *C. pseudotuberculosis* com soro humano.

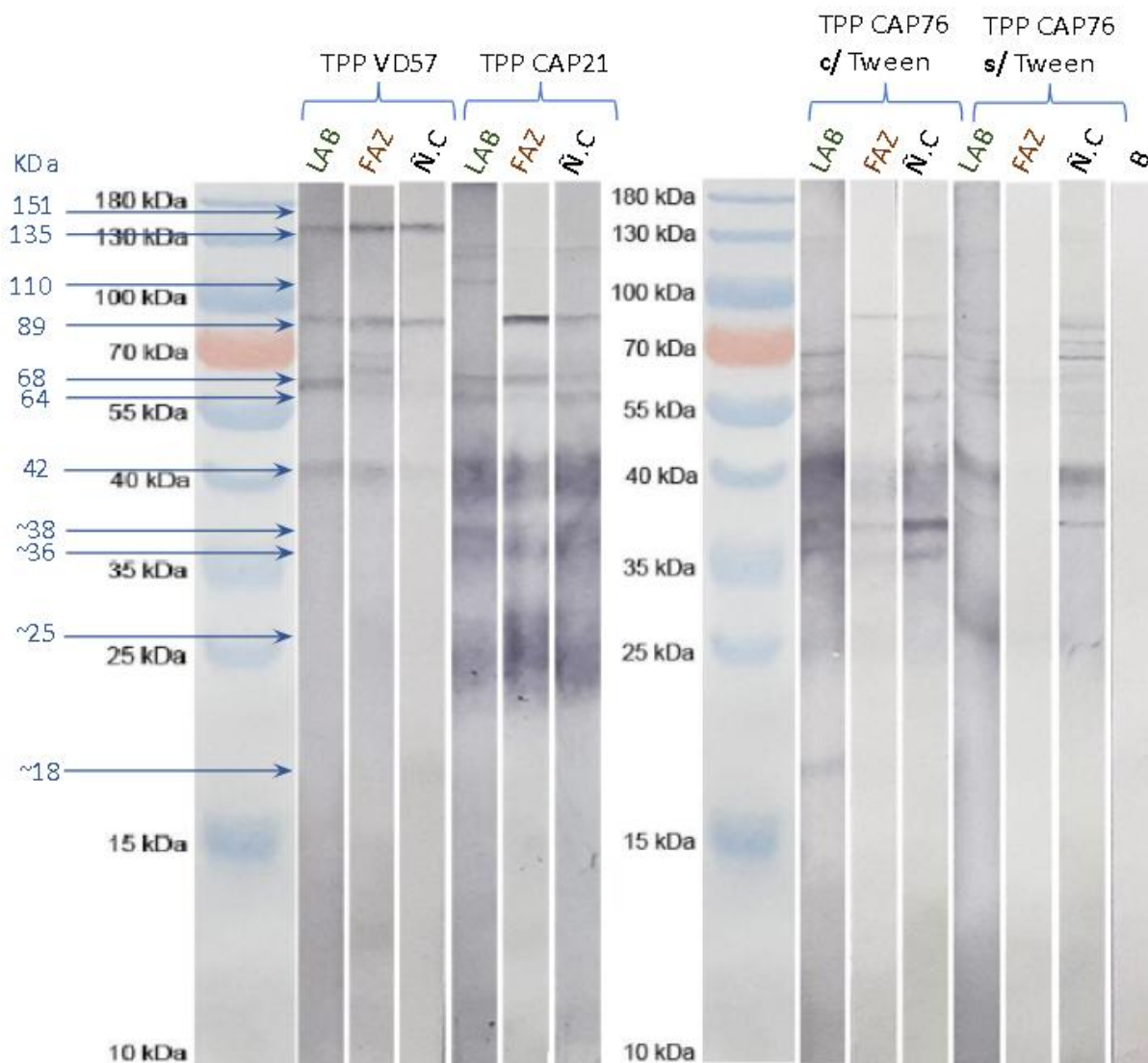


Figura 05: Western blotting em membrana de NC (0.2 micra – Bio-Rad), a partir da eletroforese em SDS-PAGE 12%. Revelação com anti-IgG humana (Life technologies) após reatividade de pool de soros de indivíduos contactantes e não contactantes com *C. pseudotuberculosis*. Extrato semi purificada por partição em três fases (*Three Phase Partitioning – TPP*, de cepas VD57, CAP21, CAP76 com e sem Tween80 cultivada em BHI caldo. Pesos moleculares analisados utilizando o programa GelAnalyzer2010. As setas indicam peso molecular aproximado. LAB - indivíduos com contato em laboratório; FAZ - indivíduos com contato em fazenda; Ñ.C - indivíduos sem contato; B - branco.

Quadro 03: Relação de PM de bandas reconhecidas nos diferentes extratos com reconhecimento pelos grupos contactantes e não contactantes

Extrato proteico	Bandas reconhecidas no pool de Contactantes e Não Contactantes	Bandas reconhecidas apenas no pool de Contactante
VD57	151; 89; 68; 64; 42	68; 64
CAP21	135; 110; 89; 68; 64; 42; 38; 36; 25	110
CAP 76 c/T	89; 68; 64; 42; 38; 36; 25; 18	X
CAP 76 s/T	89; 68; 64; 42; 38; 25	X

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 Análise comparativa da contagem e rendimento de crescimento bacteriano em diferentes tempos

Métodos como avaliação da concentração por D.O., escala de Mc Farland e cultura para contagem de unidade formadora de colônia (UFC), são comumente aplicadas na avaliação do crescimento de uma cultura microbiana. Apesar do baixo custo e fácil aplicação, esses métodos apresentam baixa precisão para contagem bacteriana, além de serem incapazes de avaliar a viabilidade das cepas do microrganismo em análise, visto que *C. pseudotuberculosis* cresce em paliça (NEBE-VON-CARON et al., 2000; SAMPAIO, 2012). Dessa maneira a aplicação da citometria de fluxo para contagem bacteriana é a opção mais adequada para realização de procedimentos que exigem velocidade e precisão nos resultados, como infecção experimental em modelo animal e controle de qualidade (GUNASEKERA, ATTFIELD, VEAL, 2000; HOEFEL et al., 2003; HAMMES et al., 2008; SÁ, 2018).

Devido a sua aplicação em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa e colaboradores do LABIMUNO-UFBA, a cepa VD57 foi selecionada como modelo

para avaliação do crescimento e viabilidade celular através de técnica de citometria de fluxo em três tempos de crescimento por 72 horas (MOURA-COSTA et al., 2008; BASTOS, 2011; RIBEIRO, 2019). As cepas CAP76 e CAP21 foram avaliadas apenas em dois tempos por 48 horas, tempo no qual esses cultivos são aplicados na obtenção de antígenos para teste em imunodiagnóstico animal e humano. Diferente de estudos prévios realizados por Sampaio (2012), em que se estabeleceu o uso da concentração final de 2x para SYBR-safe, no presente trabalho foi possível realizar a marcação de células viáveis aplicando a concentração final de 1:2 de Diamond™, reduzindo o consumo de corante por reação.

Na Figura 03, evidencia-se uma distribuição prolongada no gráfico A que se estende do ponto 10^0 ao ponto 10^4 do eixo X (bactérias), uma pequena distribuição uniforme e isolada no canto superior direito do gráfico (beads) e uma grande distribuição de eventos no canto inferior esquerdo (artefatos). Estas distribuições foram avaliadas com o uso de Gates para avaliação da fluorescência dos eventos ali presentes de forma isolada. A distribuição prolongada das bactérias no gráfico A é resultante da estrutura em forma de bacilo da *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA et al., 2008; SAMPAIO, 2012). O gráfico B apresenta a fluorescência de todos os eventos adquiridos, presentes no gráfico A. O quadrante inferior esquerdo representa dupla negatividade dos marcadores IP e Diamond™ (artefatos), que foram definidos após avaliação da autofluorescência de amostras do mesmo cultivo sem adição de corante. Apesar da elevada concentração de artefatos identificados, estes permaneciam em concentrações similares em diferentes testes da metodologia realizados, não apresentados neste trabalho. Nos quadrantes UR, UL e LR, observou-se distribuição com elevada concentração de eventos em LR, indicando que dentre os eventos caracterizados com células bacterianas marcadas, cerca de 70% correspondem a células viáveis (HOEFEL et al., 2003; SAMPAIO 2012).

Foi evidenciado crescimento superior ao descrito na literatura para a cepa VD57 em 48 horas, atingindo uma concentração de 2×10^{10} bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). As cepas CAP21 e CAP76 apresentaram crescimento compatível com o descrito por outros autores, atingindo as concentrações de $1,4 \times 10^9$ e 7×10^8 bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). Estes resultados referem-se apenas as células viáveis íntegras. Em comparação com o crescimento celular da cepa T1 evidenciado por Sampaio (2012), apresentou declínio da

viabilidade e número de células totais após 24 horas de cultivo, enquanto as cepas VD57 e CAP21 avaliadas no presente estudo, apesar de atingirem concentrações similares de células viáveis, apresentaram crescimento tardio atingindo o ápice com 48 horas de cultivo. Para CAP76 não foi evidenciada variação da concentração e viabilidade celular até 48 horas de cultivo.

4.5.2 Análise comparativa do perfil eletroforético dos extratos (SDS-PAGE)

Provas bioquímicas realizadas pela microbiologista do setor responsável pela coleção (dados não mostrados neste trabalho) confirmaram a ausência de contaminantes nos cultivos das cepas de *C. pseudotuberculosis*. As três cepas foram cultivadas sob as mesmas condições físicas, químicas e de tempo. Entretanto, o perfil eletroforético dos extratos secretados apresenta pequena variação na presença e no número de bandas, fenômeno já previsto para microorganismos de mesma espécie que evoluíram em condições ambientais distintas (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018).

Em comparação com perfil eletroforético de antígenos das cepas VD57, CAP21, CAP76, T1, Cp1002 e PAT10 obtidos por TPP, os resultados no presente trabalho reafirmam a diferença no perfil de proteínas secretadas entre as diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, apesar de outros autores utilizarem coloração com Nitrato de Prata (MEYER, 2000; VALE, 2003; PAULE et al., 2003; BASTOS, 2011; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

Apesar das cepas VD57, CAP21 e CAP76 apresentarem número de bandas similar (17, 19 e 15 respectivamente), o perfil eletroforético evidencia a diferença de expressão entre as cepas, cujas proteínas secretadas possuem diferentes pesos moleculares (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018). Ao avaliar o perfil eletroforético dos dois cultivos da cepa CAP76, foram reveladas maior número de bandas quando cultivada com Tween-80, com um acréscimo de quase 100% no número de bandas visualizadas na eletroforese.

4.5.3 Análise comparativa do perfil de reconhecimento dos antígenos presentes nos extratos por soro humano (Western Blot)

As bandas reveladas no Immunoblotting condizem com o visualizado no gel corado com Comassie Blue, apesar da menor sensibilidade deste corante em

comparação ao Nitrato de Prata na detecção de proteínas (CHEVALLET, LUCHE, RABILLOUD, 2007).

Dentre as diversas bandas visualizadas por coloração com Comassie Blue na eletroforese dos quatro extratos, de 16 a 213 KDa, onze bandas foram reveladas no immunoblotting (150, 135, 110, 89, 68, 64, 42, 38, 36, 25 e 18 KDa), sendo apenas quatro destas presentes em todos os extratos (89, 68, 64 e 42 KDa).

A sororreatividade humana avaliada em Western Blot reconheceu bandas já descritas por outros autores com as mesmas cepas ou cepas diferentes em ovinos e caprinos experimentalmente infectados (PAULE et al., 2003; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; RIBEIRO, 2019). Em comparação com o descrito por Santos (2018), dentre as principais bandas descritas pelo autor no extrato de antígeno secretado da cepa PAT10, nenhuma destas bandas foi evidenciada em Western blot com os extratos do presente trabalho.

O extrato antigênico da cepa PAT10 produzido e avaliado por Santos (2018), permitiu a discriminação entre indivíduos contactantes e não-contactantes, por revelação das bandas de 31, 71, 164 e 275 KDa, enquanto que no presente estudo as bandas de 64 e 68 KDa em VD57 são reconhecidas apenas pelos grupos Contactantes e não foi possível identificar bandas cuja reatividade permita evidenciar diferença entre Contactantes e Não Contactantes em CAP21 e CAP76. A phospholipase D (PLD) com peso molecular de 31 KDa, é um fator de virulência da *C. pseudotuberculosis* comumente descrito em experimentos de imunodiagnóstico com extratos de antígenos somáticos ou secretados de diferentes cepas, com soro humano, caprino ou ovino (PAULE et al., 2003; MOURA-COSTA et al., 2008; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

A sororreatividade de antígenos de *C. pseudotuberculosis* é bem estudada para fins de diagnóstico de infecção ou vacinas para animais (REBOUÇAS et al, 2013), e mais recentemente para humanos (SANTOS, 2018). No presente trabalho com as cepas VD57, CAP21 e CAP76 provenientes da mesma região geográfica, submédio São Francisco - Juazeiro, Bahia, Brasil (MOURA-COSTA et al, 2008; SÁ et al, 2013 e 2018), utilizando a técnica de Western blot, foi possível evidenciar diferença do grupo Contactante para grupo Não Contactante com *C. pseudotuberculosis* apenas no extrato da cepa VD57.

5 CONCLUSÃO

- A cepa VD57 apresenta crescimento tardio.

- A VD57 apresenta crescimento superior e viabilidade inferior em comparação as cepas CAP21 e CAP76 nos tempos estudados de 24 e 48 horas.

- Observa-se baixa mortalidade das três cepas em meio BHI nos tempos estudados.

- O perfil eletroforético dos extratos das cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e grande diferença no perfil eletroforético.

- A utilização de Tween-80 no meio de cultivo de CAP76 induziu grande aumento no numero de bandas.

- Os extratos apresentam antigenicidade em soro humano. Há diferença no perfil de reconhecimento de Contactantes e Não Contactantes nos extratos de VD57 e CAP21.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 89-107, 2011.

ALMEIDA, S., TIWARI, S., MARIANO, D., SOUZA, F., JARNAL, S. B., COIMBRA, N., RAITTZ, R. T., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., PEREIRA, F. L., SOARES, S. C., LEAL, CARLOS, A. G., BARH, D., GHOSH, P., FIGUEIREDO, H., MOURACOSTA, L. F., PORTELA, R. W., MEYER, R., SILVA, A., AZEVEDO, A. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. *Standards in Genomic Sciences*, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

BASTOS, B. L. Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de Quillaja saponaria como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico. Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. *Commonwealth Bureau of Animal Health*, n. 32, p. 645-657, 1962.

BERGQUIST, P. L.; HARDIMAN, E. M.; FERRARI, B. C.; WINSLEY, T.. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*, v. 13, n. 3, p. 389-401, 2009.

BOYAZOGLU, J.; HATZIMINAOGLOU, I.; MORAND-FEHR, P. The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*, v. 60, p. 13-23, Jul. 2005.

BRASIL. Censo Agropecuário 2006. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. 2006. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL. Produção da Pecuária Municipal. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. v.43, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL b. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil livre da tuberculose. Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 52 p. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/0B0CE2wqdEaReVc5V3cyMVFPcTA/view>. Acesso em: 18 de Jun. de 2019.

BUZATU D. A.; MOSKAL, T. J.; WILLIAMS, A. J.; COOPER, W. M.; MATTES, W. B.; WILKES, J. G. An Integrated Flow Cytometry-Based System for Real- Time, High Sensitivity Bacterial Detection and Identification. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; FERREIRA DE MOURA COSTA, L.; JEAN, B.; PAULE, A.; LÚCIA VALE, V.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 2, n. 1, p. 88–93, 2003.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Author manuscript*, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. Van; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, v. 75, p. 167-175, Abr. 2000.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

ELLIS, T. M.; SUTHERLAND, S. S.; WILKINSON, F. C.; MERCY, A. R.; PATON, M. W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 64, n. 9, p. 261–263, Set. 1987.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, n. 28, p. 289-301, 1991a.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, n. 28, p. 303-316, 1991b.

EMBRAPA. Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos. Divulgação digital. v.1, 2007. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/526524/linfadenite-caseosa-o-estado-da-arte>> Acesso em: 26 Jan. 2017.

Estevao-Belchior, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Jensen, D. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Ve. Argentina*, 23, p. 258–278, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, v. 76, p. 42 – 48, 2008.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley T., Hawley R. (eds) *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, ed. 3, v. 699, p. 1-29, Humana Press, 2011.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL D. A. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1228-1232, 2000.

HAMMES, F.; BERNEY, M.; WANG, Y.; VITAL, M.; KO'STER, O.; EGLI, T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, v. 42, p. 269-277, 2008.

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÅVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGEN, L.; SUNDSET, L.; SØRUM, H.; FRØLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. In: *Open forum infectious diseases*. Oxford University Press, 2015.

HOEFEL, D.; GROOBY, W. L.; MONIS, P. T.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*, n. 55, p. 585 – 597, 2003.

HOELZLE, L. E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary microbiology*, v. 164, n. 3-4, p. 359-365, 2013.

IVANOVIĆ, S.; ŽUTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; ŽUJOVIĆ, M. Caseous lymphadenitis in goats. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v. 25, n. 5-6-2, p. 999-1007, 2009.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J. L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 25, n. 9, p. 848-851, 2006.

KESLIN, M. H.; McCOY, E. L.; McCUSKER, J. J.; LUTCH, J. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: A New Cause of Infectious and Eosinophilic Pneumonia. *The American Journal of Medicine*, v. 67, n. 2, p. 228-231, 1979.

KUMAR, J. S.; PARIDA, M. M.; LAKSHMANA RAO, P. V. Development & evaluation of biotinylated DNA probe for clinical diagnosis of chikungunya infection in patients' acute phase serum & CSF samples. *Indian Journal of Medical Research*, v. 138, p. 117-124, Jul. 2013.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K.; WAHOME, R. G.; Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Veterinary Research Communications*, v. 25, p. 89–97, 2001.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 1, p. 15-22, 2010.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.

MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. *Small Ruminant Research*, n. 98, p. 39-45, 2011.

MATOS, E. D.; LEMOS, A. C. M.; BITTENCOURT, C.; MESQUITA, C. L. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 11, n. 3, p. 331-338, 2007.

MCGUIRE, A. M.; WEINER, B.; PARK, S. T. WAPINSKI, I.; RAMAN, S.; DOLGANOV, G.; PETERSON, M.; RILEY, R.; ZUCKER, J.; ABEEL, T.; WHITE, J.; SISK, P.; STOLTE, C.; KOEHRSEN, M.; YAMAMOTO, R. T.; LACOBELLI-MARTINEZ, M.; KIDD, M. J.; MAER, A. M.; SCHOOLNIK, G. K.; REGEV, A.; GALAGAN, J. Comparative analysis of *Mycobacterium* and related Actinomycetes yields insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 120, 2012.

MOURA-COSTA L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.*, v.1, n.1, p.105-115, 2002.

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, n. 1-2, p. 131-141, 2008.

MEYER, R. J. N. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência.** 2000. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2000.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 42-48, nov. 2002.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J.; HEWITT, C. J.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow

cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, n. 42, p. 97–114, 2000.

NÓBREGA, K. F. Linfadenite caseosa: Revisão e considerações sobre a utilização de vacinas no Brasil. Monografia - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, n. 56, p. 480-486, 2007.

PAPACHRISTOFOROU, C.; MARKOU, M. Overview of the economic and social importance of the livestock sector in Cyprus with particular reference to sheep and goats. *Small Ruminant Research*, n. 62, p. 193-199, 2006.

PASCUAL, C. LAWSON, P. A.; FARROW, J. A.; GIMENEZ, M. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* Based on 16s rRNA Gene Sequences. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Reino Unido, v. 45, n. 4, p. 724-728, out. 1995.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, R. C.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 96, n. 3-4, p. 129-139, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of tem cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, n. 2, p. 185- 191, 1997.

PEPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. M. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Veterinary Research*, n. 1, p. 63-82, 1994.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JÚNIOR, G.; LISTONI, F. J. P. Punção Aspirativa Com Agulha Fina No Diagnóstico do *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Na Linfadenite Caseosa Caprina. Arquivo Instituto Biologia, São Paulo, v.68, n.1, p.23-28, jan./jun. 2001.

RIBEIRO, M. B. **Aspectos da resposta imune ovina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa cp_VD57 em infecção experimental.** 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2019.

SÁ, M. C. A. GOUVEIA, G. V.; KREWER, C. DA C.; VESCHI, J. L.; DE MATTOS-GUARALDI, A. L.; DA COSTA, M. M. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. Genetics and Molecular Biology, Brasil, v. 36, n. 2, p. 265-268, fev. 2013a.

SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUVEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, M. C. A. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*: Aspectos moleculares de cepas produtoras e não produtoras de biofilme e da resposta imune por elas induzida numa infecção experimental em caprinos.** 2018. 155 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO))-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SAMPAIO, G. P. Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. 42 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia. 2012.

SANTIAGO, L. B. et al. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 46., 2009, Paraná.

SANTOS, R. M. **Estudo da Imunorreatividade Humana *in vitro* a Antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in Veterinary Science, v. 88, p. 50-55, 2010.

SILVA, W. M.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A. V.; CASTRO, T. L.; PACHECO, L. G.; SANTOS, A. R.; CIPRANDI, A.; DORELLA, F. A.; ANDRADE, H. M.; BARH, D.; PIMENTA, A. M.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Identification of 11 new

exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. *Microbial Pathogenesis*, p. 37-42, 2013.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 2, p. 223-226, 1988.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8.ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 894p, 2005.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; PAULE, 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* n. 2, p. 192–200, Jan/Dez. 2003.

VALERIO, D.; GARCÍA, A.; PEREA, J.; ACERO, R.; GÓMEZ, G. Caracterización social y comercial de los sistemas ovinos y caprinos de la región noroeste de república Dominicana. *Interciencia*, v. 34, n. 9, Set. 2009.

WILLIAMSON, L. H. Caseous Lymphadenitis en Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. n. 2,v.17, p.359-371, 2001.

7 ANEXO 01

Análise da concentração e viabilidade celular das três cepas de *C. pseudotuberculosis* por FACS.

400000	eventos adquiri- dos	Amostra	celulas vivas contada s	Nº de celulas danificadas s contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contado s	Nº de Beads contadas: do Kit	Nº de Beads contadas: do Kit	Volume do teste / µL	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Artefatos totais / µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas s contadas	celulas mortas contada s	% de artefatos contado s
04.02.19	VD57 24h	Amostra	6749	11855	2443	378902	51	49750	500	13167,17	23029,37	4766,25	739230,37	32,14	56,22	11,64	94,75
04.02.19	VD57 24h		7328	12634	2452	377529	57	49750	500	12791,86	21954,59	4280,25	659019,92	32,78	56,26	10,97	94,41
04.02.19	VD57 24h		4984	8850	1911	384194	61	49750	500	8129,64	14336,16	3117,12	626677,10	31,78	56,04	12,18	96,08
04.02.19	VD57 24h		6615	13774	2633	376930	48	49750	500	13712,34	28452,85	5457,99	781344,48	28,79	59,75	11,46	94,26
05.02.19	VD57 48h		196940	70414	1886	130263	497	49750	500	39427,63	13997,47	377,58	26078,81	73,28	26,02	0,70	32,65
05.02.19	VD57 48h		207154	73651	1850	117248	97	49750	500	212493,02	75449,72	1897,68	120269,86	73,31	26,03	0,65	29,33
05.02.19	VD57 48h		206546	78585	1823	112954	92	49750	500	223383,99	84891,89	1971,61	122162,21	72,00	27,36	0,64	28,25
05.02.19	VD57 48h		207945	81296	1884	108792	83	49750	500	249283,46	97357,75	2258,53	130419,33	71,45	27,90	0,65	27,21
06.02.19	VD57 72h		85746	132554	5022	173500	3178	49750	500	2684,62	4050,63	157,23	5432,11	38,95	58,77	2,28	44,08
06.02.19	VD57 72h		92770	178219	5031	122023	1957	49750	500	4716,72	8961,71	255,79	6204,03	33,85	64,31	1,84	30,81
06.02.19	VD57 72h		98424	187038	6477	106511	1550	49750	500	6318,19	11907,13	415,78	6837,32	33,89	63,88	2,23	26,84
06.02.19	VD57 72h		94423	191541	6470	107460	106	49750	500	88632,91	179696,06	6073,25	100870,47	32,30	65,49	2,21	26,88
400000	eventos adquiri- dos	Amostra	celulas vivas contada s	Nº de celulas danificadas s contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contado s	Nº de Beads contadas: do Kit	Nº de Beads contadas: do Kit	Volume do teste / µL	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Artefatos totais / µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas s contadas	celulas mortas contada s	% de artefatos contado s
04.02.19	CAP21 24h		58821	36477	1569	303024	109	49750	500	53694,40	33198,31	1432,25	276613,65	60,79	37,59	1,62	75,80
04.02.19	CAP21 24h		87421	63085	2392	247020	82	49750	500	106077,92	76448,76	2902,49	299737,68	57,21	41,23	1,57	61,78
05.02.19	CAP21 48h		86676	39578	894	271648	1264	49750	500	6822,99	3011,29	70,37	21383,68	68,89	30,40	0,71	68,34
05.02.19	CAP21 48h		188487	84276	1765	124591	881	49750	500	21287,69	9418,62	199,34	14071,29	68,88	30,48	0,64	31,29
200000	eventos adquiri- dos	Amostra	celulas vivas contada s	Nº de celulas danificadas s contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contado s	Nº de Beads contadas: do Kit	Nº de Beads contadas: do Kit	Volume do teste / µL	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Artefatos totais / µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas s contadas	celulas mortas contada s	% de artefatos contado s
03.01.19	CAP76 24h		95979	9119	1097	292144	1661	50600	500	5847,73	454,39	66,84	17799,50	91,82	7,13	1,05	73,65
03.01.19	CAP76 24h		90512	9133	1256	297326	1773	50600	500	5166,28	420,10	71,69	16970,89	91,31	7,42	1,27	75,00
04.01.19	CAP76 48h		125418	22237	394	250276	1675	50600	500	7577,49	1242,31	23,80	15121,15	85,68	14,05	0,27	63,10
04.01.19	CAP76 48h		134570	29508	542	233295	2085	50600	500	6531,65	1331,03	26,31	11323,48	82,79	16,87	0,33	58,94