

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

YURI NAKAU FUZISSAKI

CARACTERIZAÇÃO DA ANTIGENICIDADE E DO
EFEITO PROTETOR EM MODELO MURINO
DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE
Erysipelothrix rhusiopathiae
CANDIDATAS A ANTÍGENOS VACINAIS

São Carlos – SP
2020

YURI NAKAU FUZISSAKI

CARACTERIZAÇÃO DA ANTIGENICIDADE
E DO EFEITO PROTETOR EM MODELO MURINO
DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Erysipelothrix rhusiopathiae*
CANDIDATAS A ANTÍGENOS VACINAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo-Mansur

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Yuri Nakau Fuzissaki, realizada em 18/02/2020:

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Lea Chapaval Andri
EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio dado ao longo de toda minha vida. Nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis sem o carinho e incentivo deles. Agradeço à minha melhor amiga, companheira e namorada Joyce Etsuko Arakaki, que me aturou durante toda a faculdade, me trouxe bons momentos que nunca irei esquecer, e que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos períodos mais estressantes e desgastantes, nesses últimos 10 anos. Agradeço à minha orientadora profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur por ter me recebido em seu grupo e acreditado nas minhas competências. Agradeço aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada (LBBMA/DGE/UFSCar – São Carlos, SP, Brasil), Ana Carolina F. S. Martelli, André Alexandrino Vessoni, Beatriz Brambila, Evandro Luis Prieto, Jéssica Camila Ferreira, Célia Regina Câmara, Solange Cristina Antão e Vinícius Marquioni, pelas ajudas oferecidas, conversas e cafés descontraídos, e a Naiane Lima Godoy, que também me acompanhou e auxiliou nos ensaios com camundongos. Agradeço à profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, minha co-orientadora, Dra. Teresa Cristina Zangirolami e ao prof. Dr. Adilson José da Silva por oferecerem suporte intelectual desde o começo do projeto junto com minha orientadora. Além disso, agradeço ao prof. Dr. Adilson por ter disponibilizado o Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC/DEQ/UFSCar – São Carlos, SP, Brasil) para a manipulação de *E. rhusiopathiae*. Agradeço à Luciana Camillo e Bruna Fragelli por se disponibilizarem a me ajudar na realização do ELISA. Agradeço ao grupo do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFEE/DQ/UFSCar – São Carlos, SP, Brasil) da profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza por sempre terem me recebido tão bem, principalmente a Bruna Dionisio Soares, que sempre dedicou uma parte de seu tempo em me acompanhar nas cromatografias de exclusão molecular. Por fim, agradeço à agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Erysipelothrix rhusiopathiae é uma bactéria Gram positiva, baciliforme e encapsulada, que causa erisipela suína, doença caracterizada por lesões cutâneas e outros sinais como septicemia, artrites e endocardites nos animais afetados. Vacinas a partir de células atenuadas ou inativadas de *E. rhusiopathiae* estão disponíveis no mercado, porém não são tão eficazes no combate à forma aguda da doença, além de agravarem sintomas da forma crônica. Proteínas extracelulares de *E. rhusiopathiae* foram detectadas como sendo potencialmente antigênicas, tendo sido clonadas as sequências codificadoras de 11 genes correspondentes a essas proteínas em vetor de propagação pJET1.2/blunt e de expressão pET28. O presente trabalho visa dar continuidade a este trabalho anterior pela expressão heteróloga de quatro dessas proteínas, denominadas P1, P3, P6 e P7, para a caracterização funcional das mesmas quanto à antigenicidade *in vitro* e ao seu caráter protetor contra *E. rhusiopathiae* em modelo murino. Para isto, foram realizadas: produção em *Escherichia coli* das proteínas P1 e P7 na forma recombinante em linhagem Rosetta (DE3) e das proteínas P3 e P6 em linhagem BL21 (DE3); purificação das proteínas recombinantes por cromatografias de afinidade e exclusão molecular. Todas as proteínas recombinantes foram expressas com sucesso em *E. coli* e foram avaliadas funcionalmente quanto à (ao): antigenicidade *in vitro* por *Western blot* e ELISA utilizando soro de suínos previamente imunizados com a vacina comercial disponível; efeito protetor em camundongos, os quais foram desafiados com *E. rhusiopathiae* e monitorados quanto à sobrevivência; antigenicidade *in vitro* por ELISA utilizando soros de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com *E. rhusiopathiae*. Os resultados demonstraram que todas as proteínas foram antigênicas em suínos e camundongos, porém somente a proteína P7 proporcionou sobrevida para ao menos um dos seis camundongos desafiados. Este trabalho nos leva a concluir que a análise imunoproteômica foi uma ferramenta eficaz para a descoberta de novos potenciais antígenos de *E. rhusiopathiae*, no entanto as proteínas antigênicas possuem efeito protetor limitado para fins de proposição de novas vacinas. Novos estudos precisam ser realizados a fim de se verificar se o efeito protetor das proteínas recombinantes aqui estudadas pode ser mais eficaz por modificação da dosagem e/ou via de administração, ou ainda, se a imunização combinada da proteína P7 com outras proteínas antigênicas poderia apresentar maior eficácia protetiva contra *E. rhusiopathiae*.

Palavras-chaves: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Erisipela suína. Antigenicidade, Proteína recombinante. Vacina recombinante. Imunização.

ABSTRACT

Erysipelothrix rhusiopathiae is a gram-positive, bacilliform, and encapsulated bacterium that causes swine erysipelas, a disease characterized by skin lesions and other symptoms such as septicemia, arthritis, and endocarditis in the affected animals. Vaccines from attenuated or inactive *E. rhusiopathiae* cells are available on the market, but they are not so effective to overcome the acute form of the disease. Also, they can aggravate the symptoms of the chronic form. *E. rhusiopathiae* extracellular proteins were detected as potentially antigenic. It has previously been cloned the coding sequences for 11 genes related to these proteins in the pJET1.2/blunt vector and pET28 expression vector. The present work aims to perform heterologous expression of four of these proteins, named P1, P3, P6, and P7, for functional characterization of their *in vitro* antigenicity and protection character against *E. rhusiopathiae* in a murine model. For this, the following was performed: production of recombinant forms of P1 and P7 proteins in *Escherichia coli* Rosetta strain (DE3) and of P3 and P6 proteins in BL21 (DE3) strain; purification of the four recombinant proteins by affinity and molecular exclusion chromatography. All recombinant proteins were successfully expressed in *E. coli* and were functionally evaluated for: *in vitro* antigenicity by *Western blot* and ELISA, using sera from swine immunized with the available commercial vaccine; protective effect in mice by challenging with *E. rhusiopathiae* and monitoring of the animals survival; *in vitro* antigenicity by ELISA using sera from mice immunized with recombinant proteins and challenged with *E. rhusiopathiae*. The results demonstrated that all proteins are antigenic in pigs and mice, but only P7 protein provides survival for at least one of the six challenged mice. This work leads to the conclusion that the immunoproteomic analysis was a useful tool for the discovery of new antigens of *E. rhusiopathiae*, however, the antigenic proteins have limited protection effect for the proposals of effective new vaccines. New studies need to be carried out in order to verify whether the protective effect of the recombinant proteins studied here can be enhanced by changing the dosage or administration routes, or even by a combination of P7 protein with other antigenic proteins for a greater protective efficacy against *E. rhusiopathiae*.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Swine erisipela. Antigenicity. Recombinant protein. Recombinant vaccine. Immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mercado mundial da carne suína nos anos de 2018-2019.....	9
Figura 2. <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , bactéria causadora da erisipela suína, corada com coloração de Gram	10
Figura 3. Lesões na pele características da erisipela suína	12
Figura 4. Esquema da análise imunoproteômica para identificação de proteínas potencialmente antigênicas do sobrenadante de cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i>	18
Figura 5. Desenho da placa para quantificação de anticorpos dos soros de suínos por ELISA	27
Figura 6. Grupos para o ensaio de proteção de camundongos.....	28
Figura 7. Esquema da imunização dos camundongos para o teste de proteção pelas proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de <i>E. rhusiopathiae</i>	29
Figura 8. Desenho da placa para quantificação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i> pelo método ELISA.....	30
Figura 9. Análise por SDS-PAGE da indução da expressão das proteínas P1 e P7 de <i>E. rhusiopathiae</i> NCTC 11002 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) e da purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	31
Figura 10. Análise por SDS-PAGE de nova indução da expressão das proteínas P1 e P7 de <i>E. rhusiopathiae</i> NCTC 11002 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) e respectiva purificação por cromatografia de afinidade.....	32
Figura 11. Análise por SDS-PAGE da indução da expressão das proteínas P3 e P6 de <i>E. rhusiopathiae</i> NCTC 11002 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e suas purificações por cromatografia de afinidade.....	33
Figura 12. Cromatogramas da purificação das proteínas P1, P3, P6 e P7 recombinantes de <i>E. rhusiopathiae</i> por cromatografia de exclusão molecular	34
Figura 13. SDS-PAGE das frações da purificação das proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 por cromatografia de exclusão molecular	35
Figura 15. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> das proteínas recombinantes.....	36
Figura 14. Titulação de anticorpos contra as proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de <i>E. rhusiopathiae</i> no soro de suínos antes e após imunização com vacina comercial <i>FarrowSure B Gold</i> (Zoetis)	37
Figura 16. Curva de sobrevivência dos camundongos.....	38
Figura 17. Titulação de anticorpos contra as proteínas recombinantes nos soros de camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxonomia de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	10
Tabela 2. Características das linhagens associadas com as diferentes <i>Erysipelothrix</i> ssp. .	11
Tabela 3. Linhagens de <i>E. coli</i> e vetores utilizados neste trabalho	21
Tabela 4. Componentes para meio Feist modificado e otimizado	22
Tabela 5. Massa molecular e número de aminoácidos das proteínas nativas de <i>E.</i> <i>rhusiopathiae</i>	24
Tabela 6. Concentrações de imidazol para eluição das proteínas.....	25
Tabela 7. Quantificação das proteínas pelo método de Bradford e volumes das frações.....	35

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CpbB	Proteína B de ligação à colina (do inglês: <i>Choline-binding protein B</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da leucemia felina (do inglês: <i>Feline Leukemia Virus</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês: <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IM	Intramuscular
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (do inglês: <i>Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside</i>)
LB	Caldo de lisogenia (do inglês: <i>Lysogen Broth</i>)
NCTC	Coleção Nacional de Tipos de Culturas (do inglês: <i>National Collection of Type Cultures</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com Tween 20 (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline with Tween 20</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês: <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
PRRS	Síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (do inglês: <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i>)
SC	Subcutânea
SDS	Dodecil-sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SpaA	Antígeno protetor de superfície A (do inglês: <i>Surface protective antigen A</i>)
SpaB	Antígeno protetor de superfície B (do inglês: <i>Surface protective antigen B</i>)
SpaC	Antígeno protetor de superfície C (do inglês: <i>Surface protective antigen C</i>)

SPF	Livres de patógenos específicos (do inglês: <i>Specific Pathogen Free</i>)
TBST	Tampão Tris salino com Tween 20 (do inglês: <i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>)
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês: <i>United States Department of Agriculture</i>)
VC	Volume de coluna

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Relevância do tema	9
1.2 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	10
1.3 Erisipela suína	11
1.4 Fatores de virulência de <i>E. rhusiopathiae</i>	13
1.5 Prevenção e controle da erisipela suína.....	14
1.6 Vacinas celulares e de proteínas recombinantes	15
1.7 Trabalhos com <i>E. rhusiopathiae</i> no LBBMA.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos.....	20
3 MÉTODOS EMPREGADOS.....	21
3.1 Bactérias, meios de cultura e condições de cultivo	21
3.2 Procedimentos para eletroforese e quantificação de proteínas	22
3.3 Procedimentos de Biologia Molecular	22
3.4 Transformação de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) com os vetores de expressão contendo as regiões codificadoras de P1 e P7.....	23
3.5 Indução e análise da expressão das proteínas P1, P3, P6 e P7	23
3.6 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia líquida de afinidade e de exclusão molecular	24
3.7 <i>Western Blot</i> dos soros de suínos contra as proteínas recombinantes	25
3.8 Titulação de anticorpos contra as proteínas P1, P3, P6 e P7 nos soros de suínos	26
3.9 Ensaio em camundongos contra <i>E. rhusiopathiae</i>	28
3.9.1 Tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i>	29
3.9.2 Titulação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i>	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de <i>E. rhusiopathiae</i>	31
4.2 <i>Western Blot</i> dos soros de suínos contra as proteínas recombinantes	35
4.3 Titulação de anticorpos dos soros de suínos	36
4.4 Ensaio em camundongos contra <i>E. rhusiopathiae</i>	37
4.4.1 Tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i>	37
4.4.2 Titulação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com <i>E. rhusiopathiae</i>	39

5	CONCLUSÕES.....	41
6	PERSPECTIVAS.....	42
7	REFERÊNCIAS.....	43
	APÊNDICE A – Dados brutos e análise estatística da titulação de anticorpos dos soros de suínos vacinados e não vacinados	50
	APÊNDICE B – Dados brutos e análise estatística da titulação de anticorpos dos soros de camundongos	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema

Isolada pela primeira vez de suíno em 1882 por Louis Pasteur, a *Erysipelothrix rhusiopathiae* é uma bactéria capaz de causar uma doença conhecida como erisipela (Opriessnig & Coutinho, 2019). Ela pode atuar como patógeno ou comensal em uma grande diversidade de animais selvagens e domésticos, aves e peixes (Conklin & Steele, 1979; Wang et al., 2010).

Quando a *E. rhusiopathiae* infecta suínos, hospedeiro de maior relevância econômica, a doença causada passa a ser conhecida como erisipela suína. A carne suína é umas das mais consumidas no mundo, sendo que, em 2018, a maior parte foi produzida na China, União Europeia, Estados Unidos (EUA) e Brasil. Somos também o quarto maior exportador, com um total de 730 mil toneladas em 2018, atrás da União Europeia, EUA e Canadá, conforme o infográfico da Figura 1.



Figura 1. Mercado mundial da carne suína nos anos de 2018-2019. Fonte da imagem: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/busca-de-noticias/-/noticia/43987217/peste-suina-africana-desafio-do-brasil-e-manter-animais-livres-da-doenca-letal-e-sem-cura-mas-que-nao-afeta-humanos>; dados obtidos do USDA (U.S. Department of Agriculture).

Já foram relatados recentemente surtos de erisipela suína em países onde a suinocultura tem grande relevância econômica, inclusive no Brasil, o que tem causado preocupações (Bender et al., 2010; Coutinho et al., 2011; Ding et al., 2015; TO et al., 2012).

Apesar de raros e considerados de caráter ocupacional, casos de humanos infectados pela *E. rhusiopathiae* já foram relatados, principalmente aqueles que mantiveram contato direto com animais infectados ou seus tecidos (Opriessnig & Coutinho, 2019; Reboli & Farrar, 1989), inclusive contato com peixes de aquários e lagos contaminados (Alawdah et al., 2017; Asimaki et al., 2017; Tan et al., 2017). O principal sintoma causado pela *E. rhusiopathiae* em humanos é a infecção cutânea denominada erisipelóide (Wang et al., 2010). Uma importante observação é que a infecção cutânea ou subcutânea que ocorre em humanos, conhecida por erisipela, não tem relação com a *E. rhusiopathiae*, e sim com as bactérias do gênero *Streptococcus* (Bonnetblanc & Bédane, 2003). A transmissão humano-humano de *E. rhusiopathiae* ainda não foi reportada até o momento (Opriessnig & Coutinho,

2019).

Mesmo com vacinas disponíveis ajudando a proteger os animais da morte súbita e da septicemia ocasionada pela forma aguda da erisipela, uma ocorrência comum e cada vez mais frequente é a de suínos com sintomas de artrites e endocardites (Nagai et al., 2008; Reboli & Farrar, 1989; TO et al., 2012). Países como China, Japão e Estados Unidos têm registrado surtos da doença, inclusive entre animais vacinados (Opriessnig et al., 2004; TO et al., 2012; Zou et al., 2015).

Sendo assim, o desenvolvimento de novas vacinas contra a erisipela suína é de grande relevância, particularmente as vacinas de subunidades, compostas por antígenos específicos, por exemplo, de proteínas recombinantes.

1.2 *Erysipelothrix rhusiopathiae*

A *E. rhusiopathiae* é uma bactéria Gram-positiva (Figura 2), baciliforme, intracelular facultativa, sem flagelo, encapsulada, mesófila, não formadora de esporos e anaeróbica facultativa (Brooke & Riley, 1999; Opriessnig & Coutinho, 2019). Sua taxonomia é mostrada na Tabela 1.

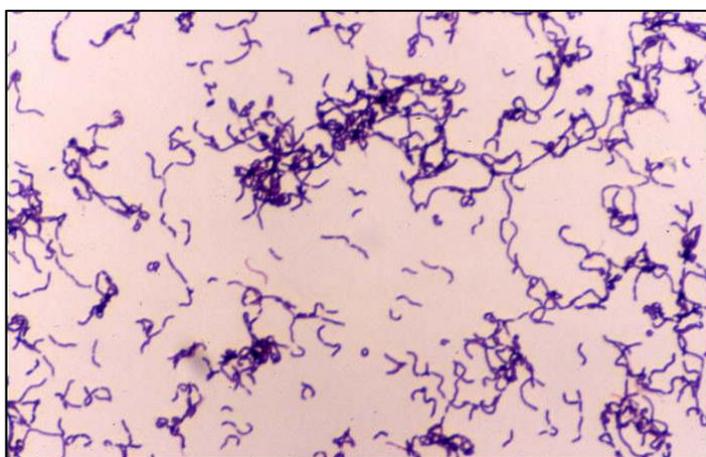


Figura 2. *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bactéria causadora da erisipela suína, corada com coloração de Gram. Fonte: http://people.upei.ca/jlewis/html/lab_4_to_6_11.html

Tabela 1. Taxonomia de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. (Ogawa et al., 2011)

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Erysipelotrichia
Ordem	Erysipelotrichales
Família	Erysipelotrichaceae
Gênero	<i>Erysipelothrix</i>
Espécie	<u><i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></u>

Até o momento, o gênero *Erysipelothrix* compreende sete espécies (Tabela 2): *E. rhusiopathiae* (Migula, 1900; Skerman et al., 1980), *E. tonsillarum* (T. Takahashi et al., 1987), *Erysipelothrix* sp. Linhagem 1, Linhagem 2, Linhagem 3 (Toshio Takahashi et al., 2008), *E. inopinata* (Verborg et al., 2004) e *E. larvae* sp. nov. (Bang et al., 2015).

Tabela 2. Características das linhagens associadas com as diferentes *Erysipelothrix* ssp.

Espécies	Isolados de	Patogênico para suínos	Sorotipos	Tipo de antígeno protetor de superfície
<i>E. rhusiopathiae</i>	Mamíferos terrestres e marinhos, pássaros, répteis, peixes e artrópodes	Sim	1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9*, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, N	A, B, C ou combinações
<i>E. tonsillarum</i>	Mamíferos terrestres e peixes	Variável	3, 7*, 10*, 14, 20, 22, 23, 25, 26	Nenhum
<i>Erysipelothrix</i> sp. linhagem 1	Suínos	Sim	13	Nenhum
<i>Erysipelothrix</i> sp. linhagem 2	Suínos	Sim	9**, 10**, 18	C
<i>Erysipelothrix</i> sp. linhagem 3	Suínos	Sim	7*	Nenhum
<i>E. inopinata</i>	Cultivo vegetal estéril-filtrado***	Não	Não determinado	Não determinado
<i>E. larvae</i> sp. nov.	Besouro	Não	Não determinado	Não determinado

*Poucas linhagens; **Maioria das linhagens; ***Nunca isolado de animal. Traduzido de (Opriessnig & Coutinho, 2019).

Erysipelothrix spp. são inativadas pelas maiorias dos desinfetantes disponíveis. Além disso, *E. rhusiopathiae* é inativada por calor úmido a 55 °C, mas é resistente a muitos métodos de preservação de alimentos e salgas (Conklin & Steele, 1979).

1.3 Erisipela suína

Os suínos são considerados os principais hospedeiros para a *E. rhusiopathiae* e é estimado que cerca de 30-50% dos suínos que aparentam estar saudáveis sejam portadores da bactéria (Opriessnig & Coutinho, 2019; Stephenson & Berman, 1978). Os portadores podem dissipar o patógeno através de suas excreções e secreções, e a bactéria pode ser detectada em fluídos orais do suíno após um período de infecção de 1 a 9 dias (Giménez-Lirola et al., 2013; Opriessnig & Coutinho, 2019). A infecção em suínos pode ocorrer pela ingestão de alimentos e água contaminados e através de lesões na pele (Giménez-Lirola et al., 2013; Opriessnig & Coutinho, 2019). Os sorotipos mais virulentos e comumente relatados em surtos de erisipela suína são 1a, 1b e 2 (Bender et al., 2010, 2011; Eamens et al., 2006; Imada et al., 2004).

A erisipela suína pode se manifestar de três formas: aguda, subaguda e crônica (Conklin & Steele, 1979; Grieco & Sheldon, 1970; Opriessnig & Coutinho, 2019; Wood, 1992). A forma aguda é caracterizada pela morte súbita do suíno ou septicemia devido à presença da bactéria na corrente sanguínea (bacteremia), que pode ocorrer aproximadamente 24 horas após a exposição ao patógeno. Outros sintomas como aborto,

depressão, febre, falta de apetite e dificuldades para se mover podem também se manifestar (Conklin & Steele, 1979; Grieco & Sheldon, 1970).

A forma subaguda é a menos severa das três. Aproximadamente 2 a 3 dias após a exposição, os animais apresentam lesões em formato de “losango” de tons rosados, avermelhados ou roxos, característica marcante da erisipela suína (Figura 3). Apesar das lesões, os indivíduos não aparentam estar doentes, não apresentando temperatura corporal alta ou persistente e o apetite do animal se encontra restabelecido (Opriessnig & Coutinho, 2019).



Figura 3. Lesões na pele características da erisipela suína. Fonte: (Opriessnig & Coutinho, 2019).

Surgindo após as outras duas e aproximadamente três semanas depois da exposição à *E. rhusiopathiae*, a forma crônica é a mais significativa economicamente, podendo se manifestar naqueles animais sobreviventes e acarretando artrites e endocardites, que podem levar à morte por insuficiência cardíaca e edema pulmonar (Opriessnig & Coutinho, 2019).

Além dos suínos, uma variedade de espécies de vertebrados e invertebrados podem ser infectados pela *E. rhusiopathiae*, incluindo ovelhas, bois, cavalos, cachorros, ursos, cangurus, crustáceos, cetáceos, peixes de água doce e salgada, galinhas, patos, águias, entre outros (Reboli & Farrar, 1989).

1.4 Fatores de virulência de *E. rhusiopathiae*

Os mecanismos de patogenicidade de *E. rhusiopathiae* ainda não são compreendidos. Sabe-se que a via de exposição à bactéria em suínos é primariamente oral, com infecções iniciais nas amígdalas ou mucosas gastrointestinais (Harada et al., 2013). Quando sequestradas pelos condrócitos de cartilagens articulares, a *E. rhusiopathiae* adquire proteção contra a resposta imune do hospedeiro, o que pode contribuir para artrites crônicas (Franz et al., 1995; Opriessnig & Coutinho, 2019).

A virulência pode variar de acordo com a diversidade de isolados de *E. rhusiopathiae* e pode ser modulada a partir de fatores de virulência como a neuraminidase, cápsula polissacarídica e proteínas de superfície (Opriessnig & Coutinho, 2019; Wang et al., 2010).

Neuraminidase é uma enzima que cliva ácido siálico das paredes celulares do animal, fornecendo assim nutrientes para a bactéria e auxiliando na adesão bacteriana e invasão das células hospedeiras (Schauer, 1985). A secreção da enzima é proporcional ao grau de virulência em linhagens de *E. rhusiopathiae* (Krasemann & Müller, 1975). Em *E. tonsillarum*, espécie não patogênica, a neuraminidase não é secretada (Wang et al., 2005). Em um trabalho de transcriptômica e proteômica foram comparadas uma linhagem virulenta e uma atenuada e sugerida a associação entre a virulência e a presença de neuraminidase (Li et al., 2016).

A enzima hialuronidase já foi considerada um fator de patogenicidade de *E. rhusiopathiae*, por facilitar a disseminação da bactéria nos tecidos do hospedeiro (Berry & Paton, 2000; Fitzgerald & Repesh, 1987; Ginsburg, 1972; Hynes & Walton, 2000). Porém, a associação da produção da enzima com a patogenicidade da bactéria foi estudada por Norrung (Norrung, 1970) utilizando isolados virulentos e não virulentos de *Erysipelothrix*, estudo que levou à conclusão de que a hialuronidase não influencia na virulência do patógeno em camundongos. A deficiência na produção de hialuronidase de fato torna a *E. rhusiopathiae* na maioria das vezes não virulenta, mas um outro fator envolvido é a perda da cápsula bacteriana. Um mutante negativo para a produção da enzima e que continha a cápsula se manteve virulento (Shimoji et al., 1994). A partir de então, foi sugerido que a ausência de virulência em *E. rhusiopathiae* está atribuída à cápsula bacteriana na maioria dos casos, fornecendo resistência à fagocitose por leucócitos e à morte intracelular em macrófagos, e que a hialuronidase não é essencial para a patogenicidade em camundongos (Shimoji, 2000; Shimoji et al., 2002).

A proteína SpaA (*Surface protective antigen A*) é o antígeno de *E. rhusiopathiae* mais bem caracterizado, mostrando efeito protetor em camundongos e suínos (Imada et al., 1999;

Makino et al., 1998; Nazierbieke et al., 2010). Ela confere capacidade de adesão da bactéria em células endoteliais do hospedeiro (Harada et al., 2014; Zhu, Cai, et al., 2017), além de recrutar plasminogênio, zimógeno da plasmina, enzima esta que degrada coágulos de fibrina, aumentando a capacidade de adesão (Zhu, Wang, et al., 2017) e inibir a ação do sistema complemento do suíno (Borrathybay et al., 2015). Portanto, a SpaA atua como um fator de patogenicidade.

Outras proteínas da família Spa, como a SpaB e SpaC, também se mostraram protetoras em camundongos, mas suas funções na virulência de *E. rhusiopathiae* ainda precisam ser elucidadas (To & Nagai, 2007). Além delas, a proteína de superfície CbpB (*Choline-binding protein B*) também apresenta um efeito protetor tanto em camundongos quanto em suínos (Shi et al., 2013; Zhu et al., 2019).

As proteínas de superfície RspA e RspB também contribuem para a virulência de *E. rhusiopathiae*. São proteínas que participam da adesão inicial e estão envolvidas na formação de biofilme (Shimoji et al., 2003). A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, do inglês: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) é considerada como um potencial fator de patogenicidade de *E. rhusiopathiae* capaz de conferir efeito protetor contra a erisipela em camundongos e suínos atuando como adesina (Zhu et al., 2018), além da sua função como catalisadora da glicólise já bem caracterizada.

Além das proteínas mencionadas acima, foi reportado que o sobrenadante concentrado de cultivos de *E. rhusiopathiae* é capaz de induzir resposta imune contra o patógeno, mas que os antígenos responsáveis não são conhecidos (Shi et al., 2013). A fim de estudar alguns desses antígenos, nosso grupo de pesquisa iniciou com Marquioni (Marquioni, 2015) a detecção de proteínas antigênicas do sobrenadante da bactéria por imunoproteômica, sendo capaz de identificar, expressar e purificar alguns deles na forma recombinante, e caracterizar funcionalmente sua antigenicidade e efeito protetor em camundongos.

1.5 Prevenção e controle da erisipela suína

Um dos importantes métodos de controle da erisipela suína é remoção ou a desinfecção regular de fontes contaminadas, limitando a propagação de *E. rhusiopathiae* no ambiente (WOOD, 1975). Além disso, a bactéria pode ser eliminada com a maioria dos desinfetantes encontrados comercialmente (Conklin & Steele, 1979; Fidalgo et al., 2002). Boa criação e manejo dos rebanhos, boas condições de higiene nos criadouros e vacinação dos suínos são outras recomendações para controlar o patógeno (Wood, 1992).

A penicilina é um dos tratamentos escolhidos para infecções com *E. rhusiopathiae*, apresentando bons resultados em suínos quando detectadas precocemente (Chuma et al., 2010; Coutinho et al., 2011; Ding et al., 2015; Zhang et al., 2015). A maioria das linhagens da bactéria também são suscetíveis a cefalosporinas, lincosamidas, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Porém, o uso de terapias antimicrobianas precisa ser avaliado cuidadosamente devido à possibilidade de seleção de isolados resistentes (Chuma et al., 2010; Coutinho et al., 2011). Genes de resistência a antibióticos localizados no cromossoma e em plasmídeos pequenos já foram descritos (Xu et al., 2015; Zhang et al., 2015), mas o mecanismo de desenvolvimento de resistência ainda é desconhecido.

As vacinas podem ser de bacterinas, as quais consistem em uma emulsão de bactérias, inativadas ou atenuadas, utilizadas para aumentar a imunidade do paciente contra um patógeno. As vacinas contra erisipela suína estão disponíveis na forma celular desde os anos 1950 (Wood, 1992) e atualmente são baseadas nos sorotipos 1 e 2 de *E. rhusiopathiae*. A vacina de células inativadas, geralmente do sorotipo 2, são para injeção intramuscular e a de linhagens atenuadas, geralmente do sorotipo 1a, são para a imunização em massa através da água potável (Eamens et al., 2006; Opriessnig et al., 2004; Opriessnig & Coutinho, 2019). O tempo de imunização das vacinas podem variar de 6 a 12 meses, para ambas formas de administração, capaz de prevenir a forma aguda da erisipela suína, mas não é eficaz na prevenção da forma crônica (Opriessnig & Coutinho, 2019; Swan & Lindsey, 1998). Devido ao baixo tempo de imunização, é necessário doses de reforço, o que acaba se tornando uma desvantagem da vacina celular. A ineficiência dessas vacinas celulares em prevenir a forma crônica da doença pode estar relacionada com o depósito de *E. rhusiopathiae* no citoplasma dos condrócitos de cartilagens articulares, como mencionado na seção anterior.

1.6 Vacinas celulares e de proteínas recombinantes

A maioria das vacinas disponíveis atualmente são baseadas em tecnologias de inativação ou atenuação de patógenos, porém havendo limitações e problemas associados a tais tecnologias, como pode ter ocorrido nos Estados Unidos em 2001, onde foram relatados casos sem explicação de erisipela em suínos vacinados e não vacinados (Opriessnig et al., 2004).

O uso de vacinas multivalentes, ou seja, compostas por duas ou mais bactérias antigênicas, são comuns e podem gerar certa preocupação. Ritzmann e Heinritz (2001) demonstraram que vacinas monovalentes (composta por somente uma bactéria antigênica)

e multivalentes protegem os animais contra a doença a ser prevenida. No entanto, a vacina monovalente, responsável por prevenir somente erisipela suína, induziu consideravelmente mais anticorpos contra *E. rhusiopathiae* do que a vacina multivalente, responsável por prevenir as doenças parvovírus e erisipela em suínos (Ritzmann & Heinritzi, 2001).

Outro motivo que pode estar relacionado a casos de erisipela suína em rebanhos vacinados é a manipulação incorreta da vacina como: armazenamento incorreto, tempo e forma de administração e período da vacinação. Surto da doença geralmente ocorre devido a imprudência do produtor em administrar somente uma dose, sendo que o recomendando são duas (Opriessnig et al., 2004).

A coinfeção (infecção do hospedeiro por dois ou mais patógenos simultaneamente) com vírus também pode ser uma causa da infecção por *E. rhusiopathiae* em suínos vacinados. Em experimento conduzido por Sakano e colaboradores (1997), foi inoculado um vírus, responsável pela síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS, do inglês: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*), em animais previamente vacinados (vacina composta de *E. rhusiopathiae* atenuada). Após a inoculação do vírus, os suínos foram desafiados com *E. rhusiopathiae*, resultando em animais com febre e lesões na pele. Os suínos que não tiveram o vírus inoculado se mantiveram saudáveis, sugerindo que o vírus PRRS pode interferir na eficácia da vacina atenuada de *E. rhusiopathiae* (Sakano et al., 1997).

Com tais limitações e problemas associados, há um grande interesse por novas tecnologias para formular vacinas mais eficazes, menos laboriosas para produção e economicamente viáveis. Uma dessas tecnologias são as vacinas de proteínas recombinantes, que são um elo entre as vacinas de subunidades (à base de antígenos produzidos pelo organismo patogênico nativo) e a tecnologia do DNA recombinante, capazes de produzir antígenos do patógeno em organismos geneticamente modificados. Em muitos casos, essa tecnologia garante uma fonte barata e inesgotável de proteínas do patógeno a fim de estudar sua patologia e possivelmente o descobrimento de novos antígenos vacinais (Francis, 2018).

Uma das primeiras vacinas veterinárias recombinantes produzidas em *E. coli* com sucesso foi baseada na glicoproteína de superfície gp70 do vírus da leucemia felina (FeLV), sendo conhecida como proteína p45 (Marciani et al., 1991). Recentemente foi liberada a venda da primeira vacina recombinante no Brasil contra o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), a *Safesui Circovírus* (Ourofino), utilizando baculovírus como sistema de expressão (Dezen, 2011).

Em humanos, vacinas recombinantes já são utilizadas para combater diversas patologias e patógenos, por exemplo, hepatite B e E, papilomavírus (HPV), meningococos B, e toxina B da cólera (Delany et al., 2014). Além delas, outras vacinas baseadas em proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* estão sendo estudadas a fim de prevenir dengue (C.-Y. Chiang et al., 2016; C. Chiang et al., 2014; Versiani et al., 2017) e doença pneumocócica (Harding et al., 2019), entre outras doenças ocasionadas pelos mais diversos tipos de patógenos.

Assim, a maior utilização de vacinas recombinantes em rebanhos suínos é uma questão de tempo, que depende de investimento na pesquisa por novos alvos e por comprovação da sua eficácia.

1.7 Trabalhos com *E. rhusiopathiae* no LBBMA

Com o objetivo de identificar e caracterizar novos antígenos de *E. rhusiopathiae*, nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada – LBBMA/ DGE/ UFSCar, S. Carlos) iniciou a detecção de proteínas antigênicas do sobrenadante do cultivo da bactéria, sendo capaz de identificar, expressar e purificar algumas delas na forma recombinante para fins de caracterização funcional.

Para identificar potenciais antígenos entre as proteínas secretadas por *E. rhusiopathiae* cultivada *in vitro*, Marquioni realizou uma análise imunoproteômica (Marquioni, 2015) (Figura 4). Nessa análise, as proteínas extracelulares bacterianas foram separadas por eletroforese bidimensional seguida de *Western Blot* com soro de suínos imunizados com a vacina celular comercialmente disponível de *E. rhusiopathiae*; os *spots* imunorreativos aos anticorpos do suíno foram isolados de um segundo gel corrido em paralelo, sendo as proteínas constituintes desses *spots* identificadas por espectrometria de massas (MS/MS). O resultado foi uma lista de proteínas candidatas a antígenos.

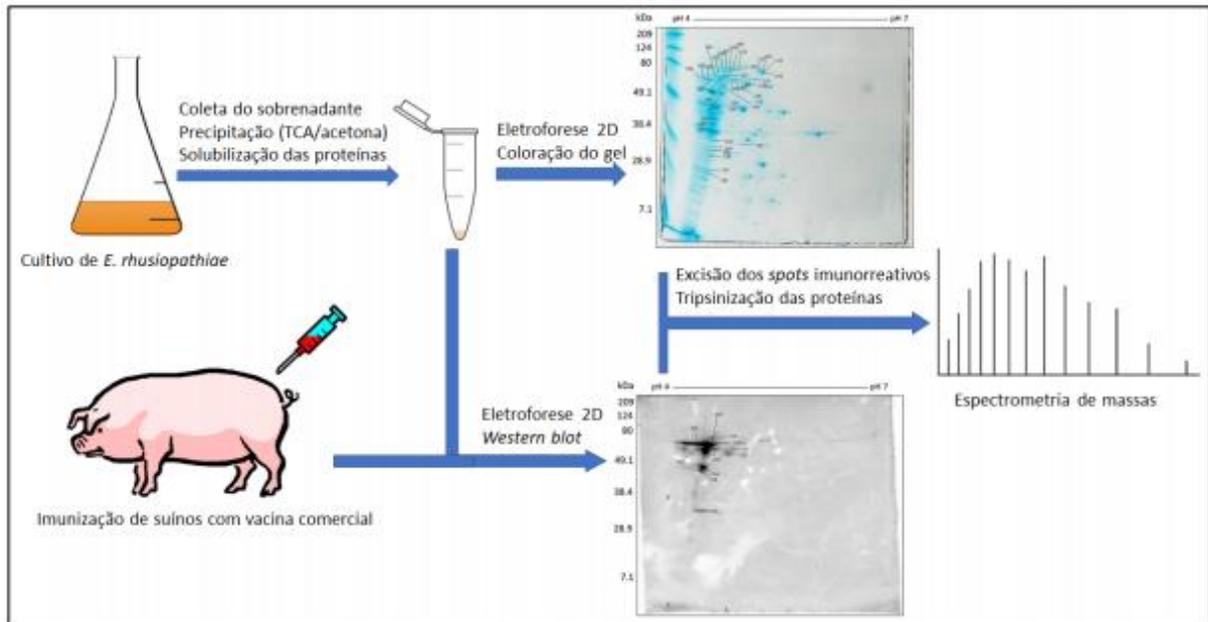


Figura 4. Esquema da análise imunoproteômica para identificação de proteínas potencialmente antigênicas do sobrenadante de cultivos de *E. rhusiopathiae*. Fonte: (Marquioni, 2015)

No trabalho de Marquioni (2018) as sequências codificadoras (CDS) de 11 das 20 proteínas identificadas foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *E. rhusiopathiae*, linhagem NCTC 11002 (oriunda da Coleção Nacional de Tipos de Culturas - NCTC), pertencente ao soro tipo A1, usando-se *primers* com sítios de restrição apropriados. A linhagem NCTC 11002 de *E. rhusiopathiae* foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva e pela Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar). Os produtos de PCR foram clonados em plasmídeo pJET1.2/blunt e utilizados para transformação de células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α . Os clones resistentes à ampicilina e que apresentaram insertos de tamanho esperado (clones positivos) foram sequenciados para confirmar a integralidade dos genes das proteínas de *E. rhusiopathiae*. Os insertos foram recuperados e ligados em plasmídeo pET28a *in frame* com a sequência codificadora de His-tag na extremidade N-terminal e, então, transformados em células competentes de *E. coli*, linhagem DH5 α . Após confirmação dos clones positivos, foram preparadas alíquotas de suspensão bacteriana para estoque permanente a -80 °C em glicerol 20%.

A expressão heteróloga das 11 proteínas de *E. rhusiopathiae* foi testada após transformação dos vetores recombinantes de pET28 em *E. coli* BL21 (DE3), mas somente duas proteínas, genericamente denominadas de P3 e P6, foram expressas, purificadas com sucesso e caracterizadas funcionalmente (Marquioni, 2018). A antigenicidade das duas proteínas foi confirmada em imunoenensaio com soros de suínos imunizados contra a vacina comercial celular de *E. rhusiopathiae* e uma proteção parcial em camundongos foi

observada. As proteínas selecionadas tinham similaridades menores que 1% com proteínas de *Sus scrofa domesticus* (suíno) e *Mus musculus* (camundongo), o que foi verificado pela utilização da ferramenta *Blastp* contra o banco de dados NCBI nr (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Marquioni, 2018).

As proteínas tiveram suas identidades preservadas (MARQUIONI 2015; MARQUIONI, 2018) e foram assim mantidas neste trabalho (e com a mesma designação anteriormente adotada), devido à possibilidade de pedido de patente de caráter pré-clínico, caso os resultados sejam promissores futuramente quanto ao efeito protetor contra a *Erysipelothrix rhusiopathiae* em modelo murino.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a antigenicidade *in vitro* e o caráter protetor *in vivo* de quatro proteínas recombinantes de *Erysipelothrix rhusiopathiae* em modelo murino.

2.2 Específicos

- Expressar na forma recombinante quatro proteínas potencialmente antigênicas de *E. rhusiopathiae*, denominadas P1, P3, P6 e P7, a partir de vetores de expressão recombinantes já disponíveis contendo os genes de interesse;
- Purificar as quatro proteínas recombinantes de *E. rhusiopathiae*;
- Detectar por meio de *Western blot* a produção de anticorpos imunorreativos às proteínas de interesse por suínos imunizados com a vacina celular comercial;
- Quantificar por ELISA os anticorpos imunorreativos às proteínas de interesse nos soros de suínos imunizados com a vacina celular comercial;
- Avaliar em modelo murino o efeito protetor das quatro proteínas recombinantes de *E. rhusiopathiae*;
- Quantificar por ELISA os anticorpos imunorreativos às proteínas de interesse nos soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*.

3 MÉTODOS EMPREGADOS

3.1 Bactérias, meios de cultura e condições de cultivo

As células de *Escherichia coli* (Tabela 3) foram reativadas a partir do estoque com 20% de glicerol a -80 °C, por incubação a 37 °C por 24 horas em meio LB contendo 1,5% de ágar (*LB Broth*, Sigma-Aldrich; *Bacteriological Agar*, Acumedia). Uma colônia de cada linhagem foi cultivada em 5 mL de meio LB (*LB Broth*, Sigma-Aldrich) a 37 °C e 250 rpm, *overnight*, em equipamento *Innova44* (New Brunswick Scientific). Em seguida, os cultivos foram vertidos em 500 mL de meio LB, quando necessário, e incubados nas mesmas condições. Os crescimentos de *E. coli* foram monitorados em equipamento *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad) pela leitura de DO_{595nm}.

Tabela 3. Linhagens de *E. coli* e vetores utilizados neste trabalho

Células	Linhagens	Vetor	Referência
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	pET28a_p1 pET28a_p7	Marquioni, 2018
	BL21 (DE3)	pET28a_p3 pET28a_p6	
	Rosetta (DE3)	-	

Células de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 pertencentes ao sorotipo 1a, utilizadas para desafiar os camundongos no ensaio de proteção, foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva e pela Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar), e pelos colaboradores do presente trabalho. As células foram reativadas por incubação a 37 °C por 3 dias em meio LB com 1,5% ágar e 30 µg/mL de canamicina. Para a propagação em meio líquido, uma colônia foi repicada em 10 mL de meio Feist modificado (Groschup & Timoney, 1990) e otimizado (Tabela 4) com mesma concentração de canamicina e incubada a 37 °C numa agitação de 200 rpm por 2 dias (Silva, 2007). O crescimento foi monitorado de acordo com sua DO_{420nm}. Os cultivos e manipulação de *E. rhusiopathiae* foram realizados no Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) do Departamento de Engenharia Química, de nível 2 de Biossegurança (DEQ/UFSCar).

Tabela 4. Componentes para meio Feist modificado e otimizado

Componente	Concentração
Glicose	9,0 g/L
Extrato de levedura	7,5 g/L
Triptona	7,5 g/L
Arginina	0,75 g/L
Fosfato de potássio	0,14 g/L
Fosfato de sódio dibásico	6,80 g/L
Tween 80	0,75 mL/L
pH 8,0	

3.2 Procedimentos para eletroforese e quantificação de proteínas

Para as separações de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), os géis foram feitos com 14% de poliacrilamida, corados com Coomassie G-250 e descorados, *overnight*, com solução composta de 10% de etanol, 2,35% de ácido fosfórico e água destilada. As amostras foram submetidas a 150 V por 2 horas em tampão de corrida (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1% SDS) em sistema *Mini-protean* (Bio-Rad). Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras celulares (pré e pós-indução da expressão) foram normalizadas para que tivessem densidade óptica a 595 nm (DO_{595nm}) de 1,0, adicionadas em tampão de Laemmli e fervidas a 100 °C. Amostras proteicas foram adicionadas em tampão de Laemmli e fervidas para separação por SDS-PAGE.

Para a quantificação das proteínas utilizando o método de Bradford foi adicionado 1 µL de solução contendo a proteína em 159 µL de água destilada e 40 µL de reagente de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent*, Bio-Rad). A absorbância resultante foi medida em equipamento *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad) em comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi realizada com albumina de soro bovino (BSA), em concentrações de 0 a 5 mg/mL. Foi substituído 1 µL de proteína por 1 µL de água destilada para a reação do “branco”, utilizada para calibrar a leitura de absorbância como zero no equipamento. Todas as reações foram feitas em triplicata.

3.3 Procedimentos de Biologia Molecular

Em geral, os procedimentos de biologia molecular como produção de células competentes e sua transformação, e purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade foram realizados segundo Sambrook e colaboradores (Sambrook & Russell, 2001), ou então descritos conforme são citados.

3.4 Transformação de *E. coli* Rosetta (DE3) com os vetores de expressão contendo as regiões codificadoras de P1 e P7

As proteínas denominadas P1 e P7 de *E. rhusiopathiae* foram expressas pela primeira vez em *E. coli* Rosetta (DE3) após sua transformação com o vetor pET28a contendo as respectivas sequências codificadoras, como descrito a seguir. Tais vetores foram construídos por V.M. Marquioni (Marquioni, 2018), e disponíveis no LBBMA.

Células de *E. coli* DH5 α contendo as sequências codificadoras de P1 e P7 em pET28a foram reativadas em meio LB ágar e propagadas em 5 mL de meio líquido, ambos com 30 μ g/mL de canamicina. Ao final, 4 mL do cultivo foi centrifugado em equipamento *Sorvall Legend Micro 17R* (Thermo Fisher Scientific) a 15.000 x *g* em tubo de centrifuga de 2 mL por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células utilizadas para a recuperação dos plasmídeos com o *kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (Cellco). Os plasmídeos foram suspensos em 50 μ L de água destilada.

Para produção de células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) as células foram cultivadas até DO_{595nm} de ~0,5 e centrifugadas em equipamento *Sorvall Legend XTR* (Thermo Fisher Scientific) a 10.000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* lavados três vezes com os respectivos volumes de 80 mL, 18 mL e 2 mL de solução contendo 25 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 20% glicerol, pH 7,4, durante 5 minutos cada lavagem. A última ressuspensão, em volume de 2 mL, foi dividida em alíquotas de 25 μ L, que foram armazenadas em *ultrafreezer* (-80 °C).

Foi adicionado 1 μ L do plasmídeo em 25 μ L de células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3), as quais foram mantidas em gelo por 20 minutos para transformação. Em seguida, foram adicionados 75 μ L de meio LB e nova incubação foi realizada a 37 °C por 50 minutos. O cultivo foi plaqueado em LB ágar com 30 μ g/mL de canamicina e 25 μ g/mL de cloranfenicol, sendo incubado a 37 °C por 24 horas. A adição de cloranfenicol é realizada para manutenção do plasmídeo pRARE, que codifica resistência para esse antibiótico e está presente na linhagem Rosetta (DE3). Uma colônia foi propagada em 5 mL de meio LB com os mesmos antibióticos a 37 °C e a 250 rpm, *overnight*. O cultivo foi dividido em alíquotas com 20% de glicerol para estoque permanente.

3.5 Indução e análise da expressão das proteínas P1, P3, P6 e P7

Diferente das proteínas P1 e P7, as proteínas P3 e P6 foram expressas a partir de *E. coli* BL21 (DE3), cujos clones estavam disponíveis como estoque permanente em nosso laboratório (Marquioni, 2018).

Quando expressos no pET28a, os genes de interesse adquirem seis histidinas, somando por volta de 1 kDa à massa molecular da proteína recombinante. Portanto, as proteínas P1, P3, P6 e P7 de *E. rhusiopathiae*, ao serem expressas em pET28a, têm massas moleculares, em kDa, de aproximadamente 64, 67, 70 e 64, respectivamente. As massas moleculares e número de aminoácidos de cada proteína em sua forma nativa estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Massa molecular e número de aminoácidos das proteínas nativas de *E. rhusiopathiae*.

Proteína nativa	Massa molecular (kDa)	Nº aminoácidos
P1	62,8	567
P3	65,8	581
P6	68,6	600
P7*	63,3	566

*O gene da proteína P7 foi clonado sem a sequência que codifica o peptídeo sinal de 37 aminoácidos (Marquioni, 2018), resultando em uma proteína com massa molecular de aproximadamente 63 kDa e 566 aminoácidos. A proteína integral tem peso molecular de aproximadamente 67 kDa e 603 aminoácidos.

Os estoques permanentes de *E. coli* BL21 (para P3 e P6) e Rosetta (P1 e P7) foram reativados em meio LB ágar e cultivados em meio LB (como descrito no item 3.1) até atingirem DO_{595nm} de aproximadamente 0,5, momento em que foi adicionado isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Invitrogen) para concentração final de 0,1 mM, e mantidos a 18 °C sob agitação a 250 rpm por 4 horas para indução da expressão das proteínas. Alíquotas de 50 μ L foram recolhidas antes e após a indução para serem analisadas por SDS-PAGE.

Confirmadas as expressões via SDS-PAGE, os cultivos foram centrifugados a 4 °C, 12.000 x *g* por 10 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 20 mL de tampão Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8,0) com 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, do inglês: *phenylmethylsulfonyl fluoride*). As suspensões foram lisadas por sonicação com 16 pulsos de 23% de amplitude por 30 segundos, com 30 segundos de intervalo entre um pulso e outro, em equipamento *Sonic Dismembrator Model 500* (Fisher Scientific). Os lisados foram centrifugados sob as mesmas condições anteriores para separar o sobrenadante (fração solúvel) dos *debris* (fração insolúvel), sendo analisados por SDS-PAGE, juntamente com as alíquotas oriundas da purificação por cromatografia de afinidade (Item 3.6).

3.6 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia líquida de afinidade e de exclusão molecular

A purificação de cada uma das proteínas recombinantes foi realizada em coluna de

cromatografia *Poly-Prep* (Bio-Rad) com 1 mL de resina *IMAC Sepharose 6 FastFlow* (GE Healthcare) carregada com sulfato de níquel. Com as colunas previamente equilibradas com tampão Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8,0), a fração solúvel foi adicionada e o eluato coletado. Em seguida, a coluna foi lavada três vezes com solução 1% de Triton e 20% de glicerol em tampão Tris-NaCl, sendo que, para cada lavagem foi utilizado 3 VC (volume de coluna; 3 mL) dessa solução. Após as lavagens, as proteínas aderidas às resinas foram eluídas e recuperadas pela adição de 3 VC (3 mL) de soluções com gradiente crescente de concentração de imidazol (Sigma-Aldrich), preparadas em mesmo tampão (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações de imidazol para eluição das proteínas

Proteína	Concentrações de Imidazol (mM)
P1	20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150 e 500
P3	2, 100 e 500
P6	2, 150 e 500
P7	20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 100, 125, 150 e 500

As frações das proteínas recombinantes (P1, P3, P6 e P7) que tiveram melhor rendimento e pureza confirmados por SDS-PAGE foram concentradas três vezes utilizando *Amicon Centriprep YM-3* (Millipore). Em seguida, prosseguiram para cromatografia de exclusão molecular em equipamento *Äkta Explorer 10 FPLC* (GE Healthcare) com coluna *HiLoad16/60* (GE Healthcare) e resina *Superdex 200* (GE Healthcare). O fluxo utilizado foi de 1 mL/minuto, e cada fração coletada continha 0,5 mL. Previamente a sua utilização, a coluna foi equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,6, o qual foi filtrado com papel qualitativo (gramatura 80g) e deaerado em lavadora ultrassônica (*Eco-Sonics*). Após a cromatografia de exclusão molecular, as proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE e quantificadas pelo método de Bradford.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) sob supervisão da Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (DQ/UFSCar- S. Carlos-SP).

3.7 Western Blot dos soros de suínos contra as proteínas recombinantes

Uma quantidade de 2 µg de cada uma das proteínas recombinantes foi submetida à SDS-PAGE, sendo as proteínas transferidas do gel para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad) em sistema *Mini-protean* (Bio-Rad), a 400 mA por 2 horas em tampão de transferência (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1% SDS, 20% metanol, pH 8,3).

As membranas foram bloqueadas *overnight* com 9% de leite em pó (*Molico*, Nestlé)

dissolvido em tampão TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,01% Tween 20, pH 8,0) e incubadas com soros de suínos antes e após imunização com a vacina comercial. Em seguida, foram adicionados anticorpos secundários anti-IgG de suínos conjugados com peroxidase (*Anti-swine IgG (H+L) Antibody, Peroxidase-Labeled, KPL*). Os soros de suínos e os anticorpos secundários foram diluídos 1:5.000 em tampão TBST e incubados com as membranas por 1 hora cada. Todas as etapas foram mantidas em agitação e, no final de cada uma foram realizadas três lavagens com TBST por 5 minutos. Foi utilizado o *kit Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) e equipamento *ChemiDoc* (Bio-Rad) para a revelação e fotodocumentação, respectivamente, das proteínas imunorreativas nas membranas de nitrocelulose.

Paralelamente ao gel que foi transferido para a membrana foi também obtido um gel com as mesmas amostras, o qual foi corado com Coomassie G-250, para ser utilizado com referência.

Os soros de suínos foram obtidos a partir de três animais diferentes (triplicata biológica) e em dois momentos: antes da imunização e após a segunda dose da vacina comercial *FarrowSure B Gold* (Zoetis) contra *E. rhusiopathiae*. Os soros foram produzidos pela empresa Cripion Biotecnologia (Andradina, SP, Brasil), tendo sido os mesmos utilizados anteriormente, tanto na análise imunoproteômica (Marquioni, 2015) como em imunoenaios subsequentes realizados por V.M. Marquioni (Marquioni, 2018).

3.8 Titulação de anticorpos contra as proteínas P1, P3, P6 e P7 nos soros de suínos

Para cada proteína recombinante P1, P3, P6 e P7, os poços de uma microplaca foram sensibilizados a 4 °C, *overnight*, com 50 ng de proteína. O bloqueio foi realizado em temperatura ambiente (25 °C) por 2 horas com 9% de leite em pó (*Molico*, Nestlé). Em seguida, os poços foram incubados em temperatura ambiente por 2 horas com soros de suínos diluídos de 1:10 até 1:10.000. Os anticorpos secundários anti-IgG de suínos conjugados com peroxidase (*Anti-swine IgG (H+L) Antibody, Peroxidase-Labeled, KPL*) foram diluídos 1:10.000 e incubados em temperatura ambiente por 2 horas (Figura 5). Todas as etapas foram realizadas em 300 µL de tampão carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9,6), ao abrigo de luz e, no final de cada uma, os poços foram lavados três vezes com 300 µL de tampão PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,005% Tween 20) em lavadora automática (*TP-Washer NM*, Thermoplate).

		Pré-imunização				3 semanas pós-1ª dose				2 semanas pós-2ª dose			
		1:10	1:100	1:1.000	1:10.000	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Suíno #1	Réplica 1	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000
	Réplica 2	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000	Suíno #1 1:10	Suíno #1 1:100	Suíno #1 1:1.000	Suíno #1 1:10.000
Suíno #2	Réplica 1	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000
	Réplica 2	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000	Suíno #2 1:10	Suíno #2 1:100	Suíno #2 1:1.000	Suíno #2 1:10.000
Suíno #3	Réplica 1	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000
	Réplica 2	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000	Suíno #3 1:10	Suíno #3 1:100	Suíno #3 1:1.000	Suíno #3 1:10.000
		Branco	Branco										

Figura 5. Desenho da placa para quantificação de anticorpos dos soros de suínos por ELISA. O mesmo desenho foi adotado para cada uma das quatro proteínas recombinantes de *E. rhusiopathiae*.

Os soros de suínos utilizados eram de três animais diferentes (triplicata biológica) de três momentos do esquema de imunização contra *E. rhusiopathiae* utilizando a vacina comercial *FarrowSure B Gold* (Zoetis): antes da vacinação, após 3 semanas da primeira dose e após 2 semanas da segunda dose (*Boost*). Os soros foram produzidos pela empresa Cripion Biotecnologia (Andradina, SP, Brasil) (como já citado no item 3.7).

Para a revelação, foi utilizado 100 µL do *kit TMB Substrate Reagent Set* (BD Bioscience) em cada poço das microplacas, ficando azulado para as proteínas imunorreativas. As reações foram interrompidas com a adição de 50 µL ácido sulfúrico 1 M, tornando a solução amarelada. A absorbância a 450 nm foi medida em equipamento *Multiskan GO Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Todas as amostras foram realizadas em duplicata como esquematizado na Figura 5.

As absorbâncias obtidas foram tratadas e submetidas ao teste ANOVA bifatorial, tendo como fatores as diluições e os momentos das imunizações. As amostras que tiveram o *p-value* menor que 0,05 foram submetidas ao teste de Tukey. As proteínas que foram consideradas antigênicas são aquelas que demonstraram *p-value* para o teste de Tukey menor que 0,05 ao comparar dados das amostras pré-imunização com os da pós 1ª dose e pós *boost*.

Para tratar os dados brutos das absorbâncias, foi feito a média das réplicas e subtraídas pela média do branco, substituindo valores negativos por zero, quando ocorrido. A análise estatística ANOVA bifatorial seguida de comparação múltipla por teste de Tukey foi realizada no *software GraphPad Prism v. 8.0.2* para sistema operacional *Windows* (San Diego, California USA). Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice A.

3.9 Ensaio em camundongos contra *E. rhusiopathiae*

O ensaio de proteção dos camundongos foi realizado no biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar (DMP/UFSCar) sob supervisão da Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal. A manipulação, cuidados e descartes foram seguidos de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (protocolo 3910060619).

Foram utilizados 84 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, isogênicas, livres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*), com 5-6 semanas de idade e pesando em média 17 gramas, todos provenientes do Biotério Geral da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os animais foram separados igualmente em 14 grupos (6 camundongos/grupo), mantidos em mini-isoladores e *rack* ventilado (*Ventilife*, Alesco) com 20 trocas de ar/hora. Todos camundongos tiveram acesso livre a água de torneira e ração para ratos e camundongos Labina (Presence). As higienizações dos mini-isoladores ocorreram duas vezes por semana, momentos em que era trocado as maravalhas e lavagem dos isoladores com água e detergente neutro.

Os 14 grupos foram classificados em: dois grupos controle positivo, dois grupos controle negativo, dois grupos referência e dois grupos teste para cada proteína recombinante estudada (quatro grupos testes) (Figura 6).

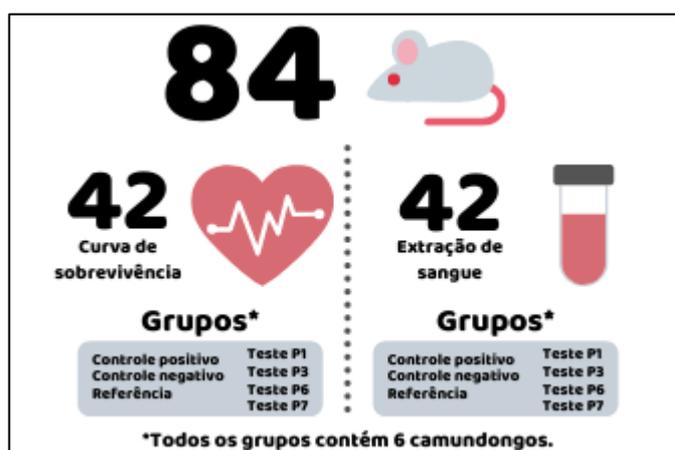


Figura 6. Grupos para o ensaio de proteção de camundongos.

Cada grupo teste recebeu duas doses de vacina com uma proteína recombinante de interesse (P1, P3, P6 e P7), sendo a primeira dose 6 semanas antes (dia -42) do desafio com *E. rhusiopathiae*, e a segunda dose, 3 semanas antes (dia -21). As vacinas foram compostas por 40 µg de proteína e 40 µg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) dissolvidas em 100 µL de PBS e administradas via subcutânea. O grupo referência recebeu uma dose única de 40 µL da vacina comercial *SUIVAC ERY-IN* (Dyntec) por via intramuscular no dia -42. Os

grupos controles receberam somente PBS nos dias -42 e -21.

Todos os grupos, exceto os controles negativos, foram desafiados contra *E. rhusiopathiae* no dia 0 como demonstrado no esquema de vacinação (Figura 7). Cada animal desafiado recebeu, por via subcutânea, um inóculo com 4.000 células de *E. rhusiopathiae* em 100 µL PBS. Os camundongos dos controles negativos receberam no dia 0, pela mesma via, somente 100 µL de PBS.

Grupo	Descrição	Dia - 42	Dia - 21	Dia 0
Controle negativo	Não vacinado e não desafiado	-	-	100 µL PBS (SC)
Controle positivo	Não vacinado e desafiado	-	-	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)
Referência	Vacina comercial e desafiado	40 µL (IM)	-	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)
Teste P1	Vacinado com a P1 e desafiado	40 µg P1 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	40 µg P1 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)
Teste P3	Vacinado com a P3 e desafiado	40 µg P3 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	40 µg P3 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)
Teste P6	Vacinado com a P6 e desafiado	40 µg P6 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	40 µg P6 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)
Teste P7	Vacinado com a P7 e desafiado	40 µg P7 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	40 µg P7 + 40 µg Al(OH) ₃ , 100 µL PBS (SC)	4.000 células <i>E. rhusiopathiae</i> , 100 µL PBS (SC)

Figura 7. Esquema da imunização dos camundongos para o teste de proteção pelas proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de *E. rhusiopathiae*. Vias de administração: IM = intramuscular; SC = subcutânea.

3.9.1 Tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*

Sete grupos, um de cada classe, foram monitorados quanto à curva de sobrevivência durante duas semanas após o desafio com *E. rhusiopathiae*. Os camundongos que sobreviveram após duas semanas de monitoramento foram eutanasiados.

3.9.2 Titulação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*

Os outros sete grupos foram monitorados até que os primeiros camundongos começassem a apresentar os sintomas de olhos praticamente fechados, postura curva e baixa mobilidade, momento em que foi extraído o máximo de sangue possível dos 42 animais por punção da veia braquial esquerda.

Os sangues dos camundongos foram coletados em tubos de vidros e misturados com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês: *ethylenediamine tetraacetic acid*)

para evitar a coagulação, e então centrifugados em equipamento *Heraeus Megafuge 16* (Thermo Fisher Scientific) a 4.900 x g por 15 minutos. Os soros foram transferidos para tubos de 1,5 mL.

Para a titulação de anticorpos dos soros de camundongos, os poços de uma microplaca foram sensibilizados a 4 °C, *overnight*, com um “*mix*” composto por 0,10 ng prot./µL de cada proteína recombinante (P1, P3, P6 e P7). O “*mix*” foi preparado em tampão carbonato-bicarbonato e 100 µL foi distribuído em todos os poços (40 ng prot./poço). O bloqueio foi realizado em temperatura ambiente por 2 horas com 9% de leite em pó. Em seguida, os poços foram incubados em temperatura ambiente por 2 horas com os soros de camundongos diluídos de 1:2 até 1:1.000, como mostrado na Figura 8. Os anticorpos secundários anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (*Anti-Mouse IgG (H&L) [HRP]*, GenScript) foram diluídos 1:5.000 e incubados em temperatura ambiente por 2 horas. Exceto pela etapa de bloqueio, que foi realizado com 200 µL em cada poço, as etapas foram realizadas em 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato ao abrigo de luz e, no final de cada uma, os poços foram lavados três vezes com 300 µL de tampão PBST.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	Branco	Controle negativo 1:2	Controle negativo 1:2	Controle negativo 1:2	Controle positivo 1:2	Controle positivo 1:2	Controle positivo 1:2	Referência 1:2	Referência 1:2	Referência 1:2	Referência 1:2
B	P1 1:10	P1 1:10	P1 1:10	P1 1:10	P1:100	P1:100	P1:100	P1:100	P1:1000	P1:1000	P1:1000	P1:1000
C	P3 1:10	P3 1:10	P3 1:10	P3 1:10	P3 1:100	P3 1:100	P3 1:100	P3 1:100	P3 1:1000	P3 1:1000	P3 1:1000	P3 1:1000
D	P6 1:10	P6 1:10	P6 1:10	P6 1:10	P6 1:100	P6 1:100	P6 1:100	P6 1:100	P6 1:1000	P6 1:1000	P6 1:1000	P6 1:1000
E	P7 1:10	P7 1:10	P7 1:10	P7 1:10	P7 1:100	P7 1:100	P7 1:100	P7 1:100	P7 1:1000	P7 1:1000	P7 1:1000	P7 1:1000
F												
G												
H												

Figura 8. Desenho da placa para quantificação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae* pelo método ELISA.

Todos os soros de camundongos eram de indivíduos diferentes, correspondendo a triplicatas biológicas, no caso dos grupos referência, controles positivo e negativo; e quadruplicatas, no caso dos grupos testes. Os soros em triplicata foram diluídos somente 1:2, enquanto os em quadruplicatas foram diluídos de 1:10 até 1:1.000 (Figura 8).

A revelação, o tratamento e a análise estatística das absorbâncias foram realizadas da mesma maneira como na quantificação de anticorpos de soros de suínos. A absorbância a 450 nm foi medida em equipamento *iMark Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad). Os dados brutos estão disponíveis no Apêndice B.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de *E. rhusiopathiae*

Após o primeiro procedimento de expressão dos genes das proteínas recombinantes P1 e P7, foram realizadas as purificações por cromatografia de afinidade com resina de níquel e eluição em gradiente de concentração de imidazol seguida da análise por SDS-PAGE (Figura 9).

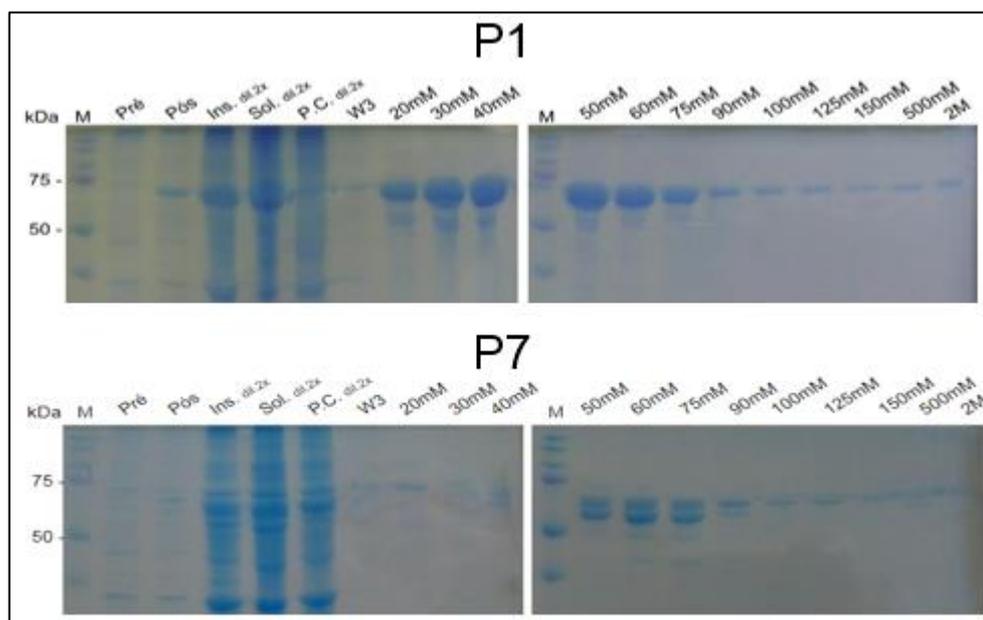


Figura 9. Análise por SDS-PAGE da indução da expressão das proteínas P1 e P7 de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 em *E. coli* Rosetta (DE3) e da purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Os extratos celulares brutos de *E. coli* obtidos antes (Pré) e após (Pós) indução com IPTG foram separados via SDS-PAGE. As amostras da fração insolúvel, solúvel e do pós-coluna foram diluídas 2 vezes (Ins. dil. 2x, Sol. dil. 2x, P.C. dil. 2x, respectivamente). O gradiente de concentração de imidazol utilizado para eluição da proteína está indicado acima de cada *lane*. Somente a terceira lavagem está representada no gel (W3). (M) Padrão de massa molecular *Precision Plus Standards Dual Color* (Bio-Rad). Cada *lane* foi carregada com 10 μ L de amostra. As massas esperadas para as proteínas recombinantes P1 e P7 são de 64 kDa, para ambas.

Comparando as amostras pré-indução com pós-indução da expressão podemos afirmar que tivemos sucesso em obter as proteínas P1 e P7 na forma recombinante, o que foi observado pelas bandas de massa molecular esperadas de aproximadamente 64 kDa (1 kDa sendo da cauda *HisTag*), para ambas proteínas. Notamos que a lise da bactéria somente por temperatura (ferver a 100 °C) não foi o suficiente para extrair a proteína P7 ao observar a ausência de uma banda bem definida na massa molecular de 64 kDa na fração Pós (Figura 9). Porém, após a lise por sonicação, fica evidente nas frações solúveis e insolúveis uma banda bem definida na massa molecular de 64 kDa, assim como nas demais frações eluídas com imidazol.

Marquioni (2018) sugeriu que tanto a P1 quanto a P7 de *E. rhusiopathiae*

necessitavam de códons raros para a sua expressão em *E. coli*, fato que foi confirmado ao substituir a linhagem BL21 (DE3) pela sua derivada, linhagem Rosetta (DE3); esta linhagem contém um plasmídeo (pRARE) que possui genes que codificam para RNAs transportadores para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA (códons raros em *E. coli*) e para resistência a cloranfenicol.

Com base nesses perfis de eluição das proteínas P1 e P7, foi realizada uma segunda expressão para aumento do seu rendimento pela eluição em uma única fração (Figura 10) de forma a viabilizar a purificação em sequência por exclusão molecular.

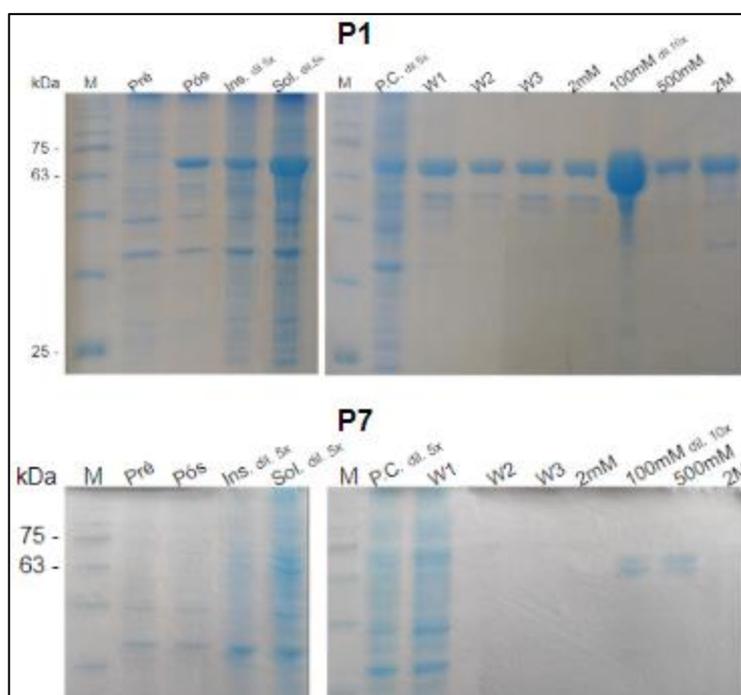


Figura 10. Análise por SDS-PAGE de nova indução da expressão das proteínas P1 e P7 de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 em *E. coli* Rosetta (DE3) e respectiva purificação por cromatografia de afinidade. Os extratos celulares brutos de *E. coli* foram obtidos antes (Pré) e após (Pós) indução com IPTG. As amostras da fração insolúvel, solúvel e do pós-coluna foram diluídas 5 vezes (Ins. dil. 5x, Sol. dil. 5x, P.C. dil. 5x, respectivamente). As concentrações de imidazol utilizadas para a eluição da proteína estão indicadas acima de cada *lane*, assim como as três lavagens (W1, W2 e W3). (M) Padrão de massa molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco). Cada *lane* foi carregada com 10 μ L de amostra. As massas esperadas para ambas as proteínas recombinantes P1 e P7 são de aproximadamente 64 kDa. Somente neste experimento para registro da imagem, a P7 foi expressa em 15 mL de cultivo.

Como as proteínas recombinantes P3 e P6 já foram expressas com sucesso no trabalho de Marquioni (Marquioni, 2018) não foi necessário fazer um gradiente de concentração de imidazol para conhecer seu perfil de eluição na cromatografia de afinidade com resina de níquel. Portanto, após confirmar a expressão da proteína P3 pela presença de uma banda esperada de 67 kDa (1 kDa de *HisTag*) na amostra pós-indução, a proteína foi eluída em maior quantidade com 100 mM de imidazol (Figura 11). O mesmo ocorreu com a P6 recombinante ao observar uma banda correspondente à massa molecular esperada de 70 kDa (1 kDa de *HisTag*) ao ser eluída com 150 mM de imidazol (Figura 11). Tais

resultados foram similares aos obtidos anteriormente (Marquioni, 2018).

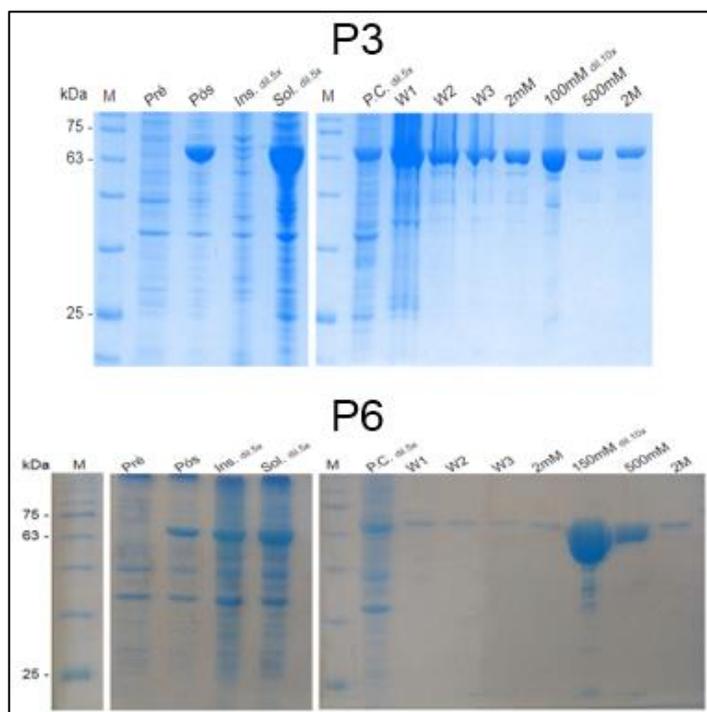


Figura 11. Análise por SDS-PAGE da indução da expressão das proteínas P3 e P6 de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 em *E. coli* BL21 (DE3) e suas purificações por cromatografia de afinidade. Os extratos celulares brutos de *E. coli* obtidos antes (Pré) e após (Pós) indução com IPTG. As amostras da fração insolúvel, solúvel e do pós-coluna foram diluídas 5 vezes (Ins. dil. 5x, Sol. dil. 5x, P.C. dil. 5x, respectivamente). As concentrações de imidazol utilizadas para eluição da proteína estão indicadas acima de cada *lane*, assim como as três lavagens (W1, W2 e W3). (M) Padrão de massa molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco). Cada *lane* foi carregada com 10 μ L de amostra. As massas esperadas para as proteínas recombinantes P3 e P6 são de 67 e 70 kDa, respectivamente.

Foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular as frações eluídas com 100 mM de imidazol contendo as proteínas P1, P3 e P7, e a fração eluída com 150 mM de imidazol contendo P6. A presença de picos bem definidos nos cromatogramas da cromatografia de exclusão molecular indica que as proteínas recombinantes foram purificadas adequadamente (Figura 12).

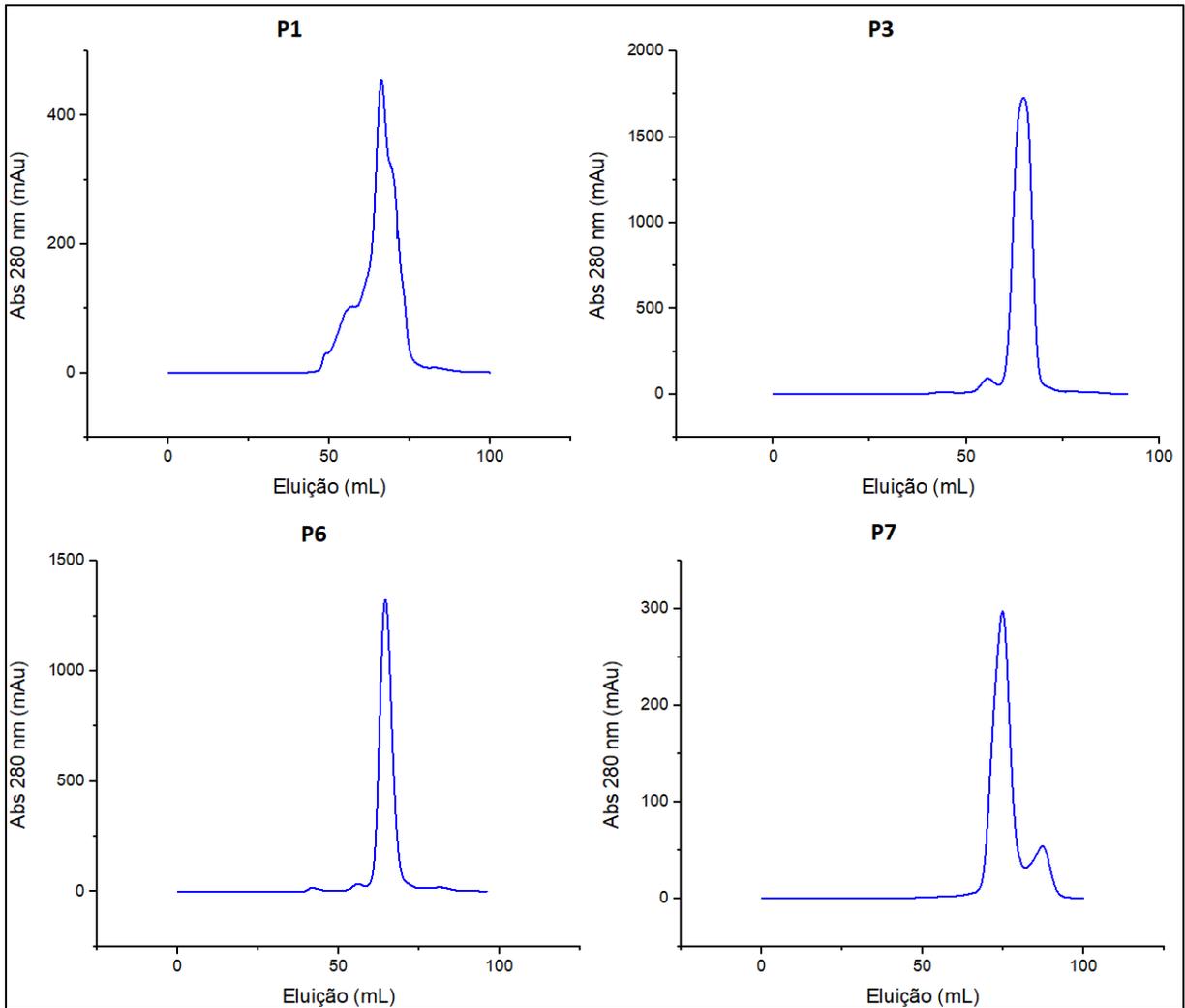


Figura 12. Cromatogramas da purificação das proteínas P1, P3, P6 e P7 recombinantes de *E. rhusiopathiae* por cromatografia de exclusão molecular. O gráfico em azul corresponde à absorbância a 280 nm (Abs_{280nm}) ao longo da purificação.

Para visualizar o resultado da cromatografia de exclusão molecular e confirmar a identidade das proteínas eluídas nos picos maiores foi feita uma eletroforese em gel de poli-acrilamida das frações (Figura 13).

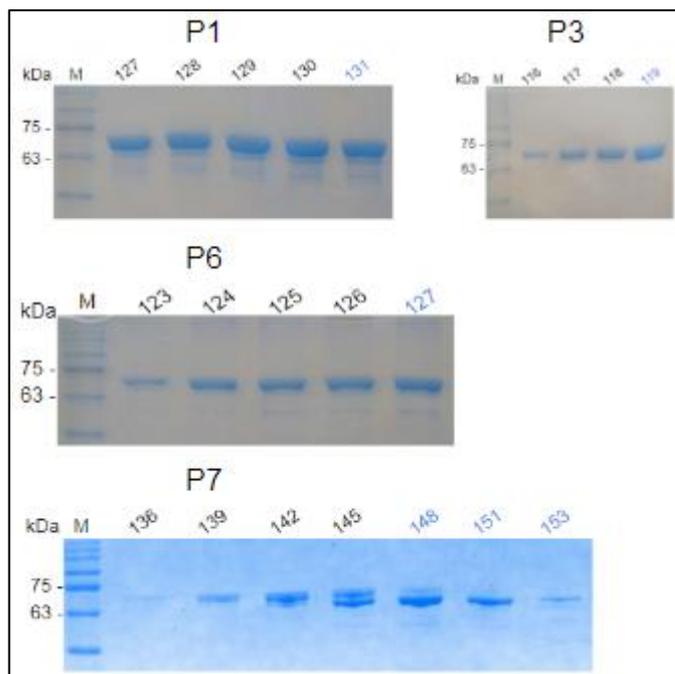


Figura 13. SDS-PAGE das frações da purificação das proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 por cromatografia de exclusão molecular. Eletroforese das frações correspondente aos picos formados nos cromatogramas da Figura 12 durante a purificação. As frações estão indicadas acima de cada *lane*. (M) Padrão de massa molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco). Cada *lane* foi carregada com 1 μ L de proteína. As massas esperadas para as proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 são de 64, 67, 70 e 64 kDa, respectivamente.

As proteínas das frações destacadas em azul na Figura 13 foram quantificadas pela metodologia de Bradford (Tabela 7).

Tabela 7. Quantificação das proteínas pelo método de Bradford e volumes das frações.

Proteína	Concentração (μ g/ μ L)	Volume aproximado (μ L)
P1 - fração 131	3,47	500
P3 - fração 119	2,50	500
P6 - fração 127	3,32	500
P7 - frações 148 a 153*	2,72	500

* As frações 148 até 153 da proteína P7 foram somadas e concentradas três vezes utilizando *Amicon Centriprep YM-3* (Millipore).

As quantidades de proteínas recombinantes obtidas foram suficientes para as próximas etapas do projeto (~600 μ g), que incluem titulação de anticorpos de soros e ensaio em camundongos.

4.2 **Western Blot dos soros de suínos contra as proteínas recombinantes**

Após a separação das proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 por SDS-PAGE, transferência para membranas de nitrocelulose e revelação, foi possível comparar os soros dos suínos antes da imunização com vacina comercial e após a segunda dose da vacinação

(Figura 14) em relação à quantidade de anticorpos imunorreativos presentes contra as proteínas de interesse.

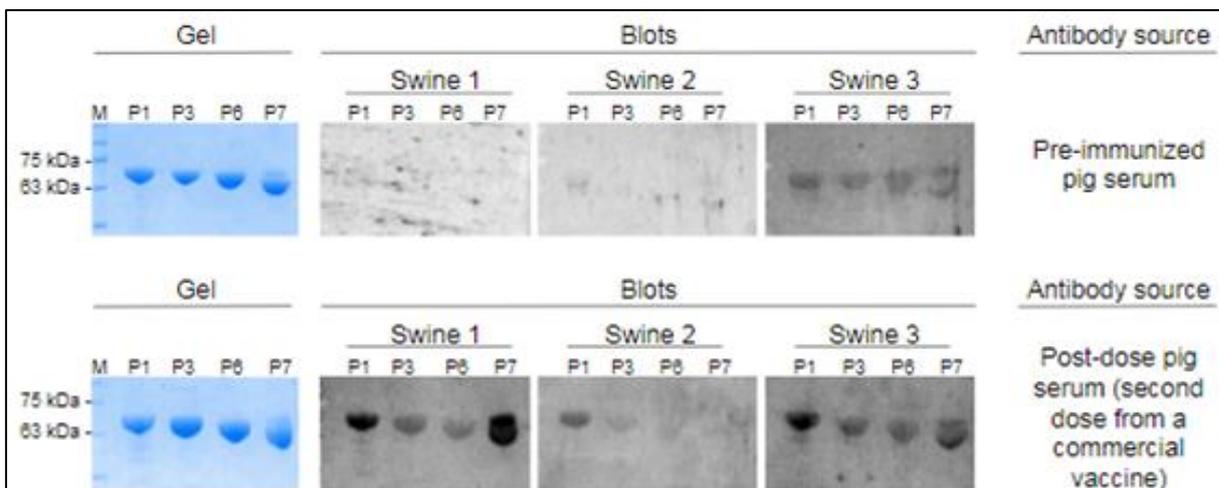


Figura 14. SDS-PAGE e Western Blot das proteínas recombinantes. (M) Marcador molecular *Protein leader BlueEye Prestained* (Cellco). Cada lane foi carregada com 2 µg de proteína recombinante. Os tamanhos esperados para as proteínas P1, P3, P6 e P7 são 64, 67, 70 e 64 kDa, respectivamente.

Em praticamente todos os suínos (triplicata biológica) houve produção de anticorpos que foram imunorreativos com as proteínas recombinantes de *E. rhusiopathiae* após a vacinação (vacina comercial composta de células inteiras de *E. rhusiopathiae*). A imunorreatividade é um indicativo de que tais proteínas têm um caráter antigênico em suínos e que estão possivelmente presentes na membrana e/ou superfície celular da bactéria.

4.3 Titulação de anticorpos dos soros de suínos

As titulações de anticorpos utilizando as quatro proteínas recombinantes e os soros de suínos pré-imunizados e após imunização (1ª dose e *boost*) contra *E. rhusiopathiae* com a vacina comercial *FarrowSure B Gold* (Zoetis) estão representadas na Figura 15.

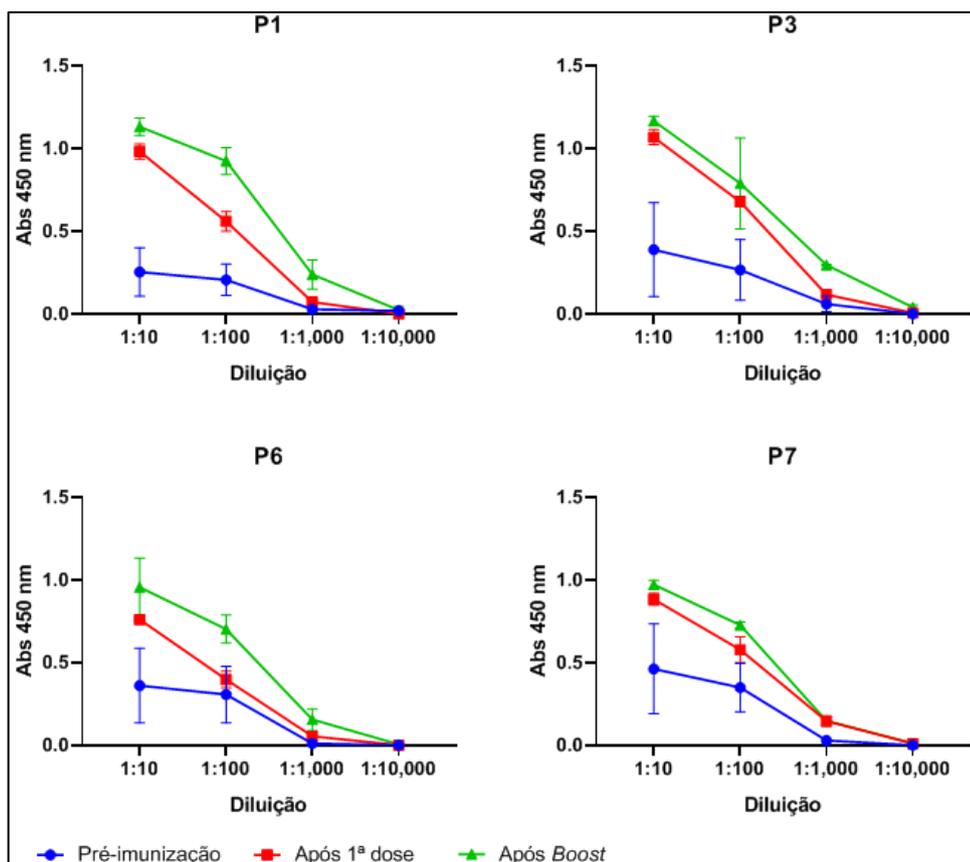


Figura 15. Titulação de anticorpos contra as proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 de *E. rhusiopathiae* no soro de suínos antes e após imunização com vacina comercial *FarrowSure B Gold* (Zoetis). Os pontos experimentais são as médias dos três suínos, e as barras representam o desvio padrão entre os suínos. Os valores 1,000 e 10,000 estão indicados como obtidos do *software* (em inglês), bem como os valores de absorbância.

Todas as proteínas apresentaram *p-value* menor que 0,0001 no teste ANOVA bifatorial para o fator “imunização”, ou seja, as proteínas recombinantes influenciaram significativamente na quantidade de anticorpos específicos detectados nos soros dos suínos imunizados. Além disso, todas foram consideradas estatisticamente antigênicas (capazes de se ligarem a anticorpos) no teste de Tukey ao comparar as curvas de titulação “pré imunização” e “pós *boost*” e apresentarem *p-value* menor que 0,0001. Os dados brutos de absorbância e os resultados das análises estatísticas realizadas no *software GraphPad Prism* se encontram no Apêndice A.

4.4 Ensaio em camundongos contra *E. rhusiopathiae*

4.4.1 Tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*

Sendo consideradas antigênicas pelos resultados obtidos na titulação de anticorpos nos soros de suínos imunizados contra *E. rhusiopathiae*, as quatro proteínas de interesse

foram utilizadas para o ensaio de proteção de camundongos contra a erisipela suína. Os resultados do ensaio são apresentados em forma de curva de sobrevivência utilizando o método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) na Figura 16.

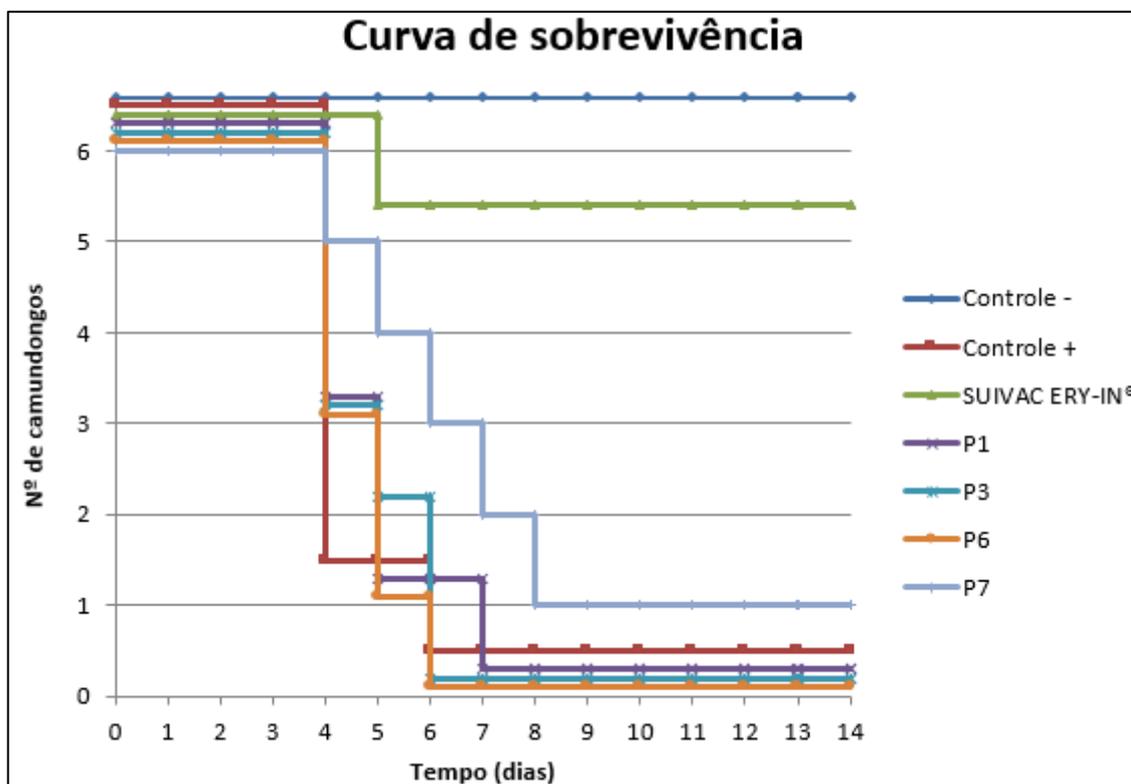


Figura 16. Curva de sobrevivência dos camundongos. O tempo de sobrevivência dos camundongos foi monitorado durante 14 dias a partir do desafio com *E. rhusiopathiae* (dia 0).

Somente o grupo teste vacinado com a proteína recombinante P7 apresentou um efeito protetor relativamente significativo ao apresentar um retardo nos sintomas da doença na maior parte dos 5 camundongos e manter vivo e sem sintomas um camundongo do grupo. O grupo referência (vacina SUIVAC ERY-IN) apresentou somente uma morte, e do controle negativo (não vacinado e não desafiado) todos os animais permaneceram vivos. Quanto aos demais grupos (controle positivo, teste com as proteínas recombinantes P1, P3 e P6) não houve nenhum camundongo que sobreviveu após uma semana do desafio, apesar da morte dos grupos testes terem sido levemente retardadas em comparação ao grupo controle positivo (não vacinado e desafiado), em que 5 dos 6 animais morreram no quarto dia após o desafio.

Todos os camundongos que morreram apresentaram fraqueza, mobilidade reduzida, postura curvada, pelagem comprometida e olhos parcialmente fechados 1-2 dias antes do óbito.

4.4.2 Titulação de anticorpos dos soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*

No terceiro dia após o desafio dos camundongos com *E. rhusiopathiae*, os indivíduos do grupo controle positivo começaram a apresentar os sintomas da erisipela suína como descrita na seção anterior, e foi então extraído o sangue de todos os animais.

As titulações de anticorpos utilizando as quatro proteínas recombinantes e os soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae* estão representadas na Figura 17.

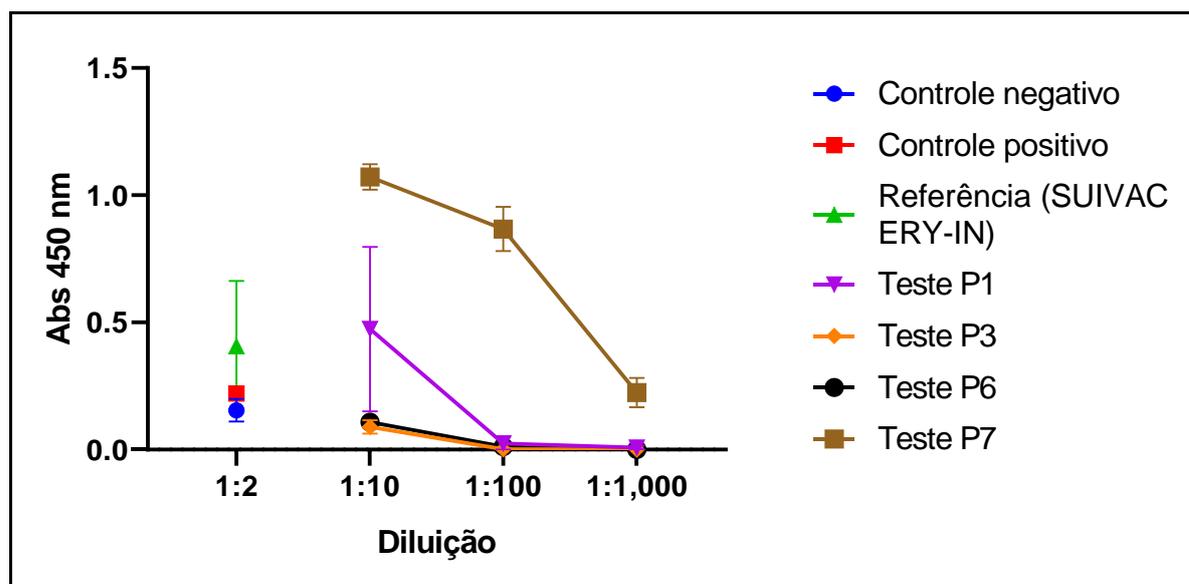


Figura 17. Titulação de anticorpos contra as proteínas recombinantes nos soros de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*. Os pontos experimentais são as médias dos camundongos, e as barras representam o desvio padrão entre os animais. O valor 1,000 está indicado como obtido do *software* (em inglês), bem como os valores de absorvância.

As curvas obtidas dos testes com as proteínas recombinantes apresentaram *p-value* menor que 0,0001 no teste ANOVA bifatorial, resultando em resposta diferentes aos tratamentos. Além disso, todas tiveram respostas estatisticamente diferentes no teste de Tukey ao comparar as curvas de titulação dos testes P1, P3 e P6 com os resultados do teste P7 e apresentarem *p-value* menor que 0,0001. As demais comparações não foram estatisticamente significativas pelo teste de Tukey.

Levando em consideração as curvas obtidas e que em todos os poços da microplaca continham as mesmas quantidades de proteínas recombinantes, podemos afirmar que a imunização com a proteína P7 resultou em uma maior produção de anticorpos específicos em comparação às outras proteínas testadas.

As absorvâncias dos grupos controles e referência não foram estatisticamente diferentes entre eles. Porém, podemos observar no gráfico da Figura 17 que a média dos pontos da diluição 1:10 dos soros de camundongos imunizados com as proteínas P1 e P7

estavam acima da média das absorbâncias obtidas na diluição 1:2 dos soros de camundongos imunizados com a vacina comercial.

A curva de titulação de anticorpos utilizando soros de camundongos imunizados com a P7 e desafiados com *E. rhusiopathiae* se manteve acima da média em relação a quantidade de anticorpos anti-P7 nos soros dos animais imunizados com a vacina comercial. Apesar da maior quantidade de anticorpos produzidos, somente a imunização com a proteína P7 não foi o suficiente para proteger os camundongos dos sintomas da doença como foi o caso da imunização com a vacina comercial, mas fica claro que houve um retardo dos sintomas, conseqüentemente retardando a morte.

Os dados brutos de absorbância e os resultados das análises estatísticas realizadas no software *GraphPad Prism* se encontram no Apêndice B.

5 CONCLUSÕES

Até o momento foram produzidas quatro proteínas de *E. rhusiopathiae* na forma recombinante, comprovando a hipótese de que as proteínas P1 e P7 de *E. rhusiopathiae* requerem a presença de códons raros para sua produção em *E. coli*, já que foi possível expressá-las em linhagem Rosetta (DE3), mas não em linhagem BL21 (DE3). Uma maior pureza das proteínas P1, P3, P6 e P7 foi obtida por cromatografia adicional de exclusão molecular, após a cromatografia de afinidade.

Todas as proteínas foram antigênicas em suínos e camundongos e conseguiram retardar os sintomas da infecção com *E. rhusiopathiae* em camundongos. Porém, foi a P7 que estimulou uma maior produção de anticorpos nos camundongos, apresentou um efeito protetor superior comparado às outras três proteínas recombinantes e foi capaz de prevenir a morte ocasionada pela doença em um dos seis animais testados.

Conclui-se que a abordagem baseada em proteômica unida à tecnologia do DNA recombinante permitiu detectar e caracterizar funcionalmente proteínas antigênicas da fração extracelular bacteriana ao comparar níveis de anticorpos de suínos e camundongos em diferentes momentos da imunização. Essas abordagens, portanto, se demonstraram úteis e eficazes em descobrir novos antígenos contra a erisipela suína, além de apresentar um sistema de expressão eficiente na produção de proteínas antigênicas contra *E. rhusiopathiae*.

6 PERSPECTIVAS

Diante da literatura e dos resultados obtidos nos ensaios em camundongos, poderão ser realizados novos ensaios *in vivo* para avaliar se uma imunização com maior quantidade da proteína recombinante P7, e por via de administração diferente, pode ocasionar em uma melhora no efeito protetor em camundongos.

Embora as proteínas recombinantes P1, P3, P6 e P7 foram em geral ineficazes individualmente na prevenção da morte dos animais pela *E. rhusiopathiae*, mais do que na produção de anticorpos, existe a possibilidade de que tais proteínas, associadas entre si ou com outras proteínas antigênicas já conhecidas, possam ainda apresentar efeito protetor contra a bactéria, o que seria de grande interesse para ser abordado em estudos posteriores.

Caso a proteção seja averiguada por alguma dessas combinações, a duração do efeito protetor poderia ser estudada, já que o nível de proteção conferido pela vacina atualmente disponível comercialmente (vacina celular) requer sucessivas doses adicionais para que os animais permaneçam protegidos da doença.

7 REFERÊNCIAS

- Alawdah, L. S., Campbell, J. N., Pollock, N., & Watnick, P. I. (2017). *Erysipelothrix rhusiopathiae* suppurative arthritis in a 12-year-old boy after an unusual fresh water exposure. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(4). <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001461>
- Asimaki, E., Nolte, O., Overesch, G., & Strahm, C. (2017). A dangerous hobby? *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia most probably acquired from freshwater aquarium fish handling. *Infection*, 45(4), 557–562.
- Bang, B. H., Rhee, M. S., Chang, D. H., Park, D. S., & Kim, B. C. (2015). *Erysipelothrix larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of the rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(2), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0342-x>
- Bender, J. S., Irwin, C. K., Shen, H. G., Schwartz, K. J., & Opriessnig, T. (2011). *Erysipelothrix* Spp. genotypes, serotypes, and surface protective antigen types associated with abattoir condemnations. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 139–142. <https://doi.org/10.1177/104063871102300126>
- Bender, J. S., Shen, H. G., Irwin, C. K., Schwartz, K. J., & Opriessnig, T. (2010). Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(10), 1605–1611. <https://doi.org/10.1128/CVI.00206-10>
- Berry, A. M., & Paton, J. C. (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infection and Immunity*, 68(1), 133–140. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.133-140.2000>
- Bonnetblanc, J., & Bédane, C. (2003). Erysipelas. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4(3), 157–163.
- Borrathybay, E., Gong, F. J., Zhang, L., & Nazierbieke, W. (2015). Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 206–216. <https://doi.org/10.4014/jmb.1407.07058>
- Brooke, C. J., & Riley, T. V. (1999). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 48(9), 789–799. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-9-789>
- Chiang, C.-Y., Liu, S.-J., Hsieh, C.-H., Chen, M.-Y., Tsai, J.-P., Liu, H.-H., Chen, I.-H., Chong, P., Leng, C.-H., & Chen, H.-W. (2016). Recombinant lipidated dengue-3 envelope protein domain III stimulates broad immune responses in mice. *Vaccine*, 34(8), 1054–1061.
- Chiang, C., Hsieh, C., Chen, M., Tsai, J., Liu, H.-H., Liu, S.-J., Chong, P., Leng, C.-H., & Chen, H.-W. (2014). Recombinant lipidated dengue-4 envelope protein domain III elicits protective immunity. *Vaccine*, 32(12), 1346–1353.

- Chuma, T., Kawamoto, T., Shahada, F., Fujimoto, H., & Okamoto, K. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in southern Japan with a modified agar dilution method. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 643–645. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0448>
- Conklin, R. H., & Steele, J. H. (1979). *Erysipelothrix* infections [Zoonoses]. *CRC Handbook Series in Zoonoses (USA)*.
- Coutinho, T. A., Imada, Y., Barcellos, D. E. S. N., Oliveira, S. J., & Moreno, A. M. (2011). Phenotypic and molecular characterization of recent and archived *Erysipelothrix* spp. isolated from Brazilian swine. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.012>
- Delany, I., Rappuoli, R., & De Gregorio, E. (2014). Vaccines for the 21st century. *EMBO Molecular Medicine*, 6(6), 708–720. <https://doi.org/10.1002/emmm.201403876>
- Dezen, D. (2011). *Desenvolvimento de uma vacina recombinante para a circovirose suína e ensaios para diagnóstico molecular de PCV2* [Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. <https://doi.org/10.16194/j.cnki.31-1059/g4.2011.07.016>
- Ding, Y., Zhu, D., Zhang, J., Yang, L., Wang, X., Chen, H., & Tan, C. (2015). Virulence determinants, antimicrobial susceptibility, and molecular profiles of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from China. *Emerging Microbes and Infections*, 4(11). <https://doi.org/10.1038/emi.2015.69>
- Eamens, G. J., Chin, J. C., Turner, B., & Barchia, I. (2006). Evaluation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccines in pigs by intradermal challenge and immune responses. *Veterinary Microbiology*, 116(1–3), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.018>
- Fidalgo, S. G., Longbottom, C. J., & Riley, T. V. (2002). Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. *Pathology*, 34(5), 462–465.
- Fitzgerald, T. J., & Repesh, L. A. (1987). The hyaluronidase associated with *Treponema pallidum* facilitates treponemal dissemination. *Infection and Immunity*, 55(5), 1023–1028.
- Francis, M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(2), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002>
- Franz, B., Davies, M. E., & Horner, A. (1995). Localization of viable bacteria and bacterial antigens in arthritic joints of *Erysipelothrix rhusiopathiae*-infected pigs. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/0928-8244\(95\)00059-G](https://doi.org/10.1016/0928-8244(95)00059-G)
- Giménez-Lirola, L. G., Xiao, C. T., Zavala, M., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *Journal of Microbiological Methods*, 92(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.014>
- Ginsburg, I. (1972). Mechanisms of Cell and Tissue Injury Induced by Group A Streptococci: Relation to Poststreptococcal Sequelae. *The Journal of Infectious Diseases*, 126(3),

294–340. <http://www.jstor.org/stable/30108619>

- Grieco, M. H., & Sheldon, C. (1970). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 174(2), 523–532.
- Groschup, M. H., & Timoney, J. F. (1990). Modified Feist broth as a serum-free alternative for enhanced production of protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2573 LP – 2575. <http://jcm.asm.org/content/28/11/2573.abstract>
- Harada, T., Ogawa, Y., Eguchi, M., Shi, F., Sato, M., Uchida, K., Nakayama, H., & Shimoji, Y. (2013). *Erysipelothrix rhusiopathiae* exploits cytokeratin 18-positive epithelial cells of porcine tonsillar crypts as an invasion gateway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153(3–4), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.013>
- Harada, T., Ogawa, Y., Eguchi, M., Shi, F., Sato, M., Uchida, K., Nakayama, H., & Shimoji, Y. (2014). Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor. *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.012>
- Harding, C. M., Nasr, M. A., Scott, N. E., Goyette-Desjardins, G., Nothhaft, H., Mayer, A. E., Chavez, S. M., Huynh, J. P., Kinsella, R. L., Szymanski, C. M., Stallings, C. L., Segura, M., & Feldman, M. F. (2019). A platform for glycoengineering a polyvalent pneumococcal bioconjugate vaccine using *E. coli* as a host. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08869-9>
- Hynes, W. L., & Walton, S. L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183(2), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00669-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00669-2)
- Imada, Y., Goji, N., Ishikawa, H., Kishima, M., & Sekizaki, T. (1999). Truncated Surface Protective Antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Serotype 1a Elicits Protection against Challenge with Serotypes 1a and 2b in Pigs. *Infection and Immunity*, 67(9), 4376–4382.
- Imada, Y., Takase, A., Kikuma, R., Iwamaru, Y., Akachi, S., & Hayakawa, Y. (2004). Serotyping of 800 Strains of *Erysipelothrix* Isolated from Pigs Affected with Erysipelas and Discrimination of Attenuated Live Vaccine Strain by Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2121–2126. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2121-2126.2004>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457–481. <https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>
- Krasemann, C., & Müller, H. E. (1975). The virulence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains and their neuraminidase production (author's transl). *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie Und Parasitologie*, 231(1–3), 206–213.
- Li, Y., Zou, Y., Xia, Y., Bai, J., Wang, X., & Jiang, P. (2016). Proteomic and transcriptomic analyses of swine pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* reveal virulence repertoire. *PLoS ONE*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159462>
- Makino, S., Yamamoto, K., Murakami, S., Shirahata, T., Uemura, K., Sawada, T., Wakamoto,

- H., & Morita, Y. (1998). Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, 25(2), 101–109.
- Marciani, D. J., Kensil, C. R., Beltz, G. A., Hung, C. ho, Cronier, J., & Aubert, A. (1991). Genetically-engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. *Vaccine*, 9(2), 89–96. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90262-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90262-5)
- Marquioni, V. M. (2015). *Immunoproteomics of Erysipelothrix rhusiopathiae: search for new antigens for recombinant vaccines*. Universidade Federal de São Carlos.
- Marquioni, V. M. (2018). *Avaliação de potenciais antígenos vacinais e geração de aptâmeros por cell-SELEX em Erysipelothrix rhusiopathiae* [Universidade Federal de São Carlos]. https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/9524/MONTEIRO_Vinicius_parcial.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Migula, W. (1900). System der Bakterien. Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der bacterien, vol. 2. G. Fischer Verlag Jena, 583.
- Nagai, S., To, H., & Kanda, A. (2008). Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the spaA gene: Discrimination of a live vaccine strain from field isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(3), 336–342. <https://doi.org/10.1177/104063870802000313>
- Nazierbieke, W., Zhang, L., He, C., Peng, Q., & Borrathybay, E. (2010). Immunity of native SpaA and recombinant SpaA-N against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*, 50(3), 367–372. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20499642>
- Norrung, V. (1970). Studies on *Erysipelothrix insidiosa* s. *rhusiopathiae*. 1. Morphology, cultural features, biochemical reactions and virulence. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 11, 577–585.
- Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T., & Shimoji, Y. (2011). The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of Firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 2959–2971. <https://doi.org/10.1128/JB.01500-10>
- Opriessnig, T., & Coutinho, T. A. (2019). Erysipelas. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine* (11th ed., pp. 835–843). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119350927>
- Opriessnig, T., Hoffman, L. J., Harris, D. L., Gaul, S. B., & Halbur, P. G. (2004). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Genetic characterization of Midwest US isolates and live commercial vaccines using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(2), 101–107. <https://doi.org/10.1177/104063870401600202>
- Reboli, A. C., & Farrar, W. E. (1989). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: An occupational pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(4), 354–359. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.354>
- Ritzmann, M., & Heinritzi, K. (2001). Detection of Erysipelas Antibodies in Vaccinated Pigs in

a Field Trial and in a Challenge Test. *Allen D. Leman Swine Conference*.

- Sakano, T., Shibata, I., Namimatsu, T., Mori, M., Ono, M., Uruno, K., & Osumi, T. (1997). Effect of Attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* Vaccine in Pigs Infected with Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(11), 977–981. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.977>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition*. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.
- Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends in Biochemical Sciences*, 10(9), 357–360.
- Shi, F., Ogawa, Y., Sano, A., Harada, T., Hirota, J., Eguchi, M., Oishi, E., & Shimoji, Y. (2013). Characterization and identification of a novel candidate vaccine protein through systematic analysis of extracellular proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infection and Immunity*, 81(12), 4333–4340. <https://doi.org/10.1128/IAI.00549-13>
- Shimoji, Y. (2000). Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*, 2(8), 965–972.
- Shimoji, Y., Asato, H., Sekizaki, T., Mori, Y., & Yokomizo, Y. (2002). Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(2), 173–176. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.173>
- Shimoji, Y., Ogawa, Y., Osaki, M., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T., & Sekizaki, T. (2003). Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2739–2748. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700253>
- Shimoji, Y., Yokomizo, Y., Sekizaki, T., Mori, Y., & Kubo, M. (1994). Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infection and Immunity*, 62(7), 2806–2810. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005671>
- Silva, A. J. da. (2007). *Otimização das condições de cultivo de Erysipelothrix rhusiopathiae para produção de vacina contra erisipela suína* [Universidade Federal de São Carlos]. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6943>
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(1), 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Stephenson, E. H., & Berman, D. T. (1978). Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from tonsils of apparently normal swine by two methods. *American Journal of Veterinary Research*, 39(1), 187–188.
- Swan, R. A., & Lindsey, M. J. (1998). Treatment and control by vaccination of erysipelas in farmed emus (*Dromaius novohollandiae*). *Australian Veterinary Journal*, 76(5), 325–327. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb12356.x>
- Takahashi, T., Sawada, T., Muramatsu, M., Tamura, Y., Fujisawa, T., Benno, Y., & Mitsuoka, T. (1987). Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(3), 536–539.

- Takahashi, Toshio, Fujisawa, T., Umeno, A., Kozasa, T., Yamamoto, K., & Sawada, T. (2008). A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. *Microbiology and Immunology*, *52*(10), 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00061.x>
- Tan, E. M., Marcelin, J. R., Adeel, N., Lewis, R. J., Enzler, M. J., & Tosh, P. K. (2017). *Erysipelothrix rhusiopathiae* bloodstream infection—A 22-year experience at Mayo Clinic, Minnesota. *Zoonoses and Public Health*, *64*(7), e65–e72.
- To, H., & Nagai, S. (2007). Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, *14*(7), 813–820. <https://doi.org/10.1128/CVI.00099-07>
- TO, H., SATO, H., TAZUMI, A., TSUTSUMI, N., NAGAI, S., IWATA, A., & NAGANO, T. (2012). Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *74*(7), 949–953. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0533>
- Verbarg, S., Rheims, H., Emus, S., Frühling, A., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., & Schumann, P. (2004). *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(1), 221–225. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02898-0>
- Versiani, A. F., Astigarraga, R. G., Rocha, E. S. O., Barboza, A. P. M., Kroon, E. G., Rachid, M. A., Souza, D. G., Ladeira, L. O., Barbosa-Stancioli, E. F., & Jorio, A. (2017). Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. *Journal of Nanobiotechnology*, *15*(1), 26.
- Wang, Q., Chang, B. J., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2005). Neuraminidase production by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology*, *107*(3–4), 265–272.
- Wang, Q., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2010). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology*, *140*(3–4), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.012>
- Wood, R. L. (1992). Erysipelas, p 475–486. *Diseases of Swine, 7th Ed. Iowa State University Press, Ames, IA.*
- Xu, C. W., Zhang, A. Y., Yang, C. M., Pan, Y., Guan, Z. Bin, Lei, C. W., Peng, L. Y., Li, Q. Z., & Wang, H. N. (2015). First report of macrolide resistance gene erm(T) harbored by a novel small plasmid from *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(4), 2462–2465. <https://doi.org/10.1128/AAC.00228-15>
- Zhang, A., Xu, C., Wang, H., Lei, C., Liu, B., Guan, Z., Yang, C., Yang, Y., & Peng, L. (2015). Presence and new genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *Isa(E)* in *Erysipelothrix rhusiopathiae* of swine origin. *Veterinary Microbiology*, *177*(1–2), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.014>
- Zhu, W., Cai, C., Li, J., Zhang, Q., Huang, J., & Jin, M. (2019). Characterization of protective antigen CbpB as an adhesin and a plasminogen-binding protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Research in Veterinary Science*, *124*(January), 352–356. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.04.002>

- Zhu, W., Cai, C., Wang, Y., Li, J., Wu, C., Kang, C., Sun, X., & Jin, M. (2017). Characterization of roles of SpaA in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 113, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.020>
- Zhu, W., Wang, Y., Cai, C., Li, J., Wu, C., Kang, C., & Jin, M. (2017). *Erysipelothrix rhusiopathiae* recruits host plasminogen via the major protective antigen SpaA. *FEMS Microbiology Letters*, 364(5), 1–5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx036>
- Zhu, W., Wu, C., Kang, C., Cai, C., Wang, Y., Li, J., Zhang, Q., Sun, X., & Jin, M. (2018). Evaluation of the protective efficacy of four newly identified surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vaccine*, 36(52), 8079–8083. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.071>
- Zou, Y., Zhu, X., Muhammad, H. M., Jiang, P., & Li, Y. (2015). Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from acute swine erysipelas outbreaks in Eastern China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(6), 653–660. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0589>

APÊNDICE A – Dados brutos e análise estatística da titulação de anticorpos dos soros de suínos vacinados e não vacinados

Abs 450 nm - Soros de suínos

P3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,253	0,162	0,123	0,09	1,207	0,84	0,218	0,098	1,32	1,155	0,453	0,134
B	0,219	0,188	0,12	0,078	1,203	0,719	0,201	0,092	1,252	1,076	0,306	0,136
C	0,295	0,351	0,122	0,078	1,037	0,75	0,223	0,104	1,228	1,079	0,385	0,135
D	0,508	0,334	0,115	0,074	1,192	0,823	0,218	0,049	1,253	0,074	0,082	0,071
E	0,89	0,556	0,223	0,076	1,12	0,702	0,19	0,102	1,187	0,919	0,379	0,098
F	0,687	0,528	0,181	0,093	1,18	0,761	0,178	0,094	1,287	0,961	0,393	0,124
G	0,057	0,049										
H												

P6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,327	0,268	0,111	0,063	0,954	0,489	0,173	0,066	0,907	0,812	0,214	0,108
B	0,275	0,24	0,086	0,065	0,813	0,454	0,23	0,104	0,899	0,659	0,222	0,088
C	0,521	0,429	0,138	0,109	0,892	0,573	0,199	0,079	1,044	0,861	0,332	0,139
D	0,307	0,451	0,114	0,122	0,861	0,572	0,167	0,098	1,107	0,948	0,364	0,14
E	0,678	0,61	0,139	0,106	0,889	0,512	0,151	0,094	1,473	0,799	0,263	0,114
F	0,796	0,578	0,168	0,127	0,893	0,528	0,144	0,096	1,042	0,872	0,273	0,118
G	0,046	0,053										
H												

P1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,207	0,219	0,123	0,088	1,078	0,613	0,163	0,076	1,308	1,036	0,361	0,079
B	0,236	0,192	0,103	0,089	1,043	0,62	0,154	0,069	1,157	0,964	0,27	0,094
C	0,244	0,265	0,104	0,093	1,118	0,701	0,147	0,069	1,294	1,102	0,447	0,115
D	0,286	0,23	0,094	0,102	1,077	0,695	0,151	0,07	1,181	1,053	0,348	0,127
E	0,5	0,401	0,108	0,093	1,068	0,55	0,126	0,085	1,193	0,914	0,244	0,095
F	0,491	0,371	0,083	0,083	0,947	0,62	0,131	0,061	1,098	0,917	0,202	0,069
G	0,044	0,051										
H												

P7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,243	0,289	0,133	0,102	0,994	0,646	0,297	0,13	1,109	0,839	0,277	0,107
B	0,296	0,328	0,113	0,084	0,96	0,564	0,258	0,124	1,122	0,886	0,284	0,115
C	0,603	0,482	0,147	0,11	0,997	0,686	0,268	0,145	1,007	0,777	0,231	0,177
D	0,737	0,482	0,143	0,082	1,08	0,745	0,287	0,119	1,137	0,878	0,306	0,12
E	0,798	0,571	0,16	0,113	0,982	0,873	0,225	0,816	1,09	0,879	0,238	0,103
F	0,78	0,624	0,165	0,121	0,971	0,639	0,361	0,096	1,048	0,783	0,232	0,112
G	0,047	0,044										
H												

APÊNDICE A - CONTINUAÇÃO

Teste ANOVA bifatorial realizado software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Table Analyzed P1

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0,05

Source of Variation % of total variation P value P value summary Significant?

Interaction	15,53	<0,0001	****	Yes
Diluição	61,6	<0,0001	****	Yes
Imunização	21,06	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,9214	6	0,1536	F (6, 24) = 34,30	P<0,0001
Diluição	3,655	3	1,218	F (3, 24) = 272,1	P<0,0001
Imunização	1,25	2	0,6249	F (2, 24) = 139,6	P<0,0001
Residual	0,1074	24	0,004477		

Teste de Tukey realizado no software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Compare column means (main column effect)

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test Mean Diff, 95,00% CI of diff, Significant Summary Adjusted P Value

Pré-imunização vs. Após 1ª dose	-0,2767	-0,3449 to -0,2085	Yes	****	<0,0001
Pré-imunização vs. Após Boost	-0,4527	-0,5209 to -0,3845	Yes	****	<0,0001
Após 1ª dose vs. Após Boost	-0,176	-0,2442 to -0,1078	Yes	****	<0,0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff, SE of diff	N1	N2	q	DF
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	0,1265	0,4032	-0,2767 0,02732	12	12	14,32	24
Pré-imunização vs. Após Boost	0,1265	0,5792	-0,4527 0,02732	12	12	23,44	24
Após 1ª dose vs. Após Boost	0,4032	0,5792	-0,176 0,02732	12	12	9,112	24

APÊNDICE A - CONTINUAÇÃO

Teste ANOVA bifatorial realizado software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Table Analyzed P3

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	10,16	0,0004	***	Yes
Diluição	67,33	<0,0001	****	Yes
Imunização	16,17	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,6298	6		0,105 F (6, 24) = 6,416	P=0,0004
Diluição	4,172	3		1,391 F (3, 24) = 85,01	P<0,0001
Imunização	1,002	2		0,5009 F (2, 24) = 30,62	P<0,0001
Residual	0,3926	24		0,01636	

Teste de Tukey realizado no software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Compare column means (main column effect)

Number of families 1
 Number of comparisons per family 3
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	-0,2893 -0,4197 to -0,1588	Yes	****	<0,0001
Pré-imunização vs. Após Boost	-0,3946 -0,5250 to -0,2642	Yes	****	<0,0001
Após 1ª dose vs. Após Boost	-0,1053 -0,2357 to 0,02507	No	ns	0,1297

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff, N1	N2	q	DF
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	0,1782	0,4674	-0,2893	0,05222	12	12	7,834
Pré-imunização vs. Após Boost	0,1782	0,5728	-0,3946	0,05222	12	12	10,69
Após 1ª dose vs. Após Boost	0,4674	0,5728	-0,1053	0,05222	12	12	2,853

APÊNDICE A - CONTINUAÇÃO

Teste ANOVA bifatorial realizado software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Table Analyzed P6

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0,05

Source of Variation % of total variation P value P value summary Significant?

Interaction	8,846	0,001	***	Yes
Diluição	72,61	<0,0001	****	Yes
Imunização	12,19	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,3533	6	0,05889	F (6, 24) = 5,575	P=0,0010
Diluição	2,9	3	0,9668	F (3, 24) = 91,52	P<0,0001
Imunização	0,4871	2	0,2436	F (2, 24) = 23,06	P<0,0001
Residual	0,2535	24	0,01056		

Teste de Tukey realizado no software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Compare column means (main column effect)

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test **Mean Diff, 95,00% CI of diff,** **Significant?** **Summary** **Adjusted P Value**

Pré-imunização vs. Após 1ª dose	-0,1335 -0,2383 to -0,02871	Yes	*	0,0108
Pré-imunização vs. Após Boost	-0,2848 -0,3895 to -0,1800	Yes	****	<0,0001
Após 1ª dose vs. Após Boost	-0,1513 -0,2560 to -0,04646	Yes	**	0,0039

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff, N1	N2	q	DF
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	0,1696	0,3031	-0,1335	0,04196	12	12	4,5
Pré-imunização vs. Após Boost	0,1696	0,4543	-0,2848	0,04196	12	12	9,597
Após 1ª dose vs. Após Boost	0,3031	0,4543	-0,1513	0,04196	12	12	5,098

APÊNDICE A - CONTINUAÇÃO

Teste ANOVA bifatorial realizado software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Table Analyzed P7

Two-way ANOVA Ordinary
Alpha 0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	5,99	0,0018	**	Yes
Diluição	79,75	<0,0001	****	Yes
Imunização	9,501	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,2667	6		0,04445 F (6, 24) = 5,034	P=0,0018
Diluição	3,551	3		1,184 F (3, 24) = 134,1	P<0,0001
Imunização	0,423	2		0,2115 F (2, 24) = 23,95	P<0,0001
Residual	0,2119	24		0,008829	

Teste de Tukey realizado no software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Compare column means (main column effect)

Number of families 1
Number of comparisons per family 3
Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	-0,1942 -0,2900 to -0,09837	Yes	***	0,0001
Pré-imunização vs. Após Boost	-0,2539 -0,3497 to -0,1581	Yes	****	<0,0001
Após 1ª dose vs. Após Boost	-0,05975 -0,1555 to 0,03605	No	ns	0,283

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff, N1	N2	q	DF	
Pré-imunização vs. Após 1ª dose	0,2105	0,4047	-0,1942	0,03836	12	12	7,158	24
Pré-imunização vs. Após Boost	0,2105	0,4644	-0,2539	0,03836	12	12	9,361	24
Após 1ª dose vs. Após Boost	0,4047	0,4644	-0,05975	0,03836	12	12	2,203	24

APÊNDICE B – Dados brutos e análise estatística da titulação de anticorpos dos soros de camundongos

Abs 450 nm - Soros de camundongos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	0,078	0,277	0,274	0,285	0,196	0,18	0,264	0,236	0,563	0,28	0,782
B	0,613	0,956	0,273	0,288	0,125	0,067	0,071	0,066	0,074	0,071	0,059	0,063
C	0,186	0,141	0,14	0,125	0,066	0,049	0,047	0,046	0,039	0,041	0,038	0,035
D	0,176	0,164	0,145	0,182	0,09	0,072	0,041	0,061	0,045	0,048	0,043	0,041
E	1,12	1,098	1,101	1,204	0,802	0,952	1,005	0,944	0,274	0,317	0,336	0,206
F												
G												
H												

Teste ANOVA bifatorial realizado software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Table Analyzed ELISA mix recomb - testes

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	16,09	<0,0001 ****		Yes
Diluição	17,96	<0,0001 ****		Yes
Testes	60,32	<0,0001 ****		Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction		1,027	6	0,1711 F (6, 36) = 17,16	P<0,0001
Diluição		1,146	2	0,5731 F (2, 36) = 57,45	P<0,0001
Testes		3,849	3	1,283 F (3, 36) = 128,6	P<0,0001

Teste de Tukey realizado no software GraphPad Prism v. 8.0.2 para Windows

Compare column means (main column effect)

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff, 95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Teste P1 vs. Teste P3	0,1382 0,02839 to 0,2480	Yes	**	0,0089
Teste P1 vs. Teste P6	0,1286 0,01881 to 0,2384	Yes	*	0,0163
Teste P1 vs. Teste P7	-0,5528 -0,6626 to -0,4429	Yes	****	<0,0001
Teste P3 vs. Teste P6	-0,00958 -0,1194 to 0,1002	No	ns	0,9953
Teste P3 vs. Teste P7	-0,691 -0,8008 to -0,5811	Yes	****	<0,0001
Teste P6 vs. Teste P7	-0,6814 -0,7912 to -0,5716	Yes	****	<0,0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff, N1	N2	q	DF	
Teste P1 vs. Teste P3	0,1687	0,03046	0,1382	0,04078	12	12	4,794	36
Teste P1 vs. Teste P6	0,1687	0,04004	0,1286	0,04078	12	12	4,461	36
Teste P1 vs. Teste P7	0,1687	0,7214	-0,5528	0,04078	12	12	19,17	36
Teste P3 vs. Teste P6	0,03046	0,04004	-0,009583	0,04078	12	12	0,3324	36
Teste P3 vs. Teste P7	0,03046	0,7214	-0,691	0,04078	12	12	23,96	36
Teste P6 vs. Teste P7	0,04004	0,7214	-0,6814	0,04078	12	12	23,63	36