

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR – PPGGEv**  
**LABORATÓRIO DE INFLAMAÇÃO E DOENÇAS INFECCIOSAS - LIDI**  
**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA - LBBMA**

**NAIANE LIMA GODOY**

**IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE**  
*Erysipelothrix rhusiopathiae*: **PROTEÇÃO EM UM MODELO MURINO**

**SÃO CARLOS**

**2023**

**NAIANE LIMA GODOY**

**IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
*Erysipelothrix rhusiopathiae*: PROTEÇÃO EM UM MODELO MURINO**

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética  
Evolutiva e Biologia Molecular – área de  
concentração: Bioquímica e Biologia  
Molecular.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Marques Novo Mansur

**SÃO CARLOS**

**2023**

Godoy, Naiane Lima

Imunogenicidade de proteínas recombinantes de  
Erysipelothrix rhusiopathiae: proteção em um modelo  
murino / Naiane Lima Godoy -- 2023.  
90f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,  
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Fernanda de, Freitas Anibal

Banca Examinadora: Paula Cristina de Souza Souto,  
Luciana Camillo, André Vessoni Alexandrino, Adilson

Jose da Silva

Bibliografia

1. Erisipela suína. 2. Vacina. 3. Imunização. I. Godoy,  
Naiane Lima. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



# 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

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Naiane Lima Godoy, realizada em 08/12/2023.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Profa. Dra. Paula Cristina de Souza Souto (UFMT)

Profa. Dra. Luciana Camillo (UFSCar)

Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino (UNICEP)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

*Dedico esta tese à minha família,  
meus pais Antônia e Charlon, minha  
irmã Rafaela e meu noivo Jhonne  
Pedro, que verdadeiramente fazem  
dos meus sonhos os deles também.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antônia e Charlon, pelo amor incondicional e pela dedicação. Por causa de vocês não tive outras preocupações a não ser estudar, e nunca vou esquecer todo seu suporte e carinho sinceros que tornaram esse trabalho possível.

Ao meu amor de longa data, Jhonne Pedro, que desde que começamos a namorar no segundo ano da faculdade tem me acompanhado e participado de todos os meus sonhos para o futuro. Obrigada por todo carinho, apoio e incentivo ao longo dessa jornada que começamos a 13 anos atrás.

A minha irmã, Rafaela, que passou a adolescência inteira me vendo passar pela pós-graduação, acabou por fazer a faculdade na mesma universidade e ainda foi intimada várias vezes para a limpeza do biotério e das gaiolas dos camundongos. Você é o meu maior orgulho e alegria, te amo muito.

Aos meus queridos sogros, Luci e João, por todo o amor, incentivo e lições de vida ao longo dos anos.

Ao meu querido amigo, Joelson, pela longa amizade e apoio sinceros, e por proporcionar tantos momentos felizes nas nossas vidas.

Ao Pablo, pela amizade, companheirismo e momentos descontraídos.

Aos amigos Naiana e Thiago, por todo o carinho, consideração e apoio em São Carlos.

Aos meus amigos João Pedro e Tatiele, pelos vários momentos de desabafo, alegria e descontração.

A minha amiga da escola até hoje, Gabrielle, por todos os momentos inesquecíveis de felicidade e sincera amizade.

A Bruna, Carol, Cynthia, Joice, Karina, Krissia, Laiza, Luciana, Mariana, Mateus, Paulo Andrade, Ricardo e Yuli, colegas do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, pela disposição e ajuda essencial tanto na parte prática quanto na parte teórica desse trabalho. Sempre pude contar com vocês.

Ao todos os demais colegas do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, por todo companheirismo e ajuda em diversos momentos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Yuri e a Joyce, companheiros de imunização de camundongos e experimentos. Muito obrigada por toda a amizade e carinho nos momentos difíceis da pós-graduação.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada, André, Bia, Carol, Evandro, Inae, Jéssica, Regina, Solange, Regina e Vinícius por me ensinarem e acolherem no grupo. Sempre vou me lembrar da paciência e amizade de vocês.

A Ione e ao Jonathan pelo auxílio no início do trabalho.

A Cintia, Sheyla e a todos aos demais colegas do Departamento de Engenharia Química que contribuíram significativamente na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adilson José da Silva e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Zangirolami, também do Departamento de Engenharia Química, pela parceria e auxílio prestados, importantíssimos no decorrer de todo o trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce, Bruna, Kátia e Kelly do Departamento de Química pela disponibilidade e auxílio no uso de equipamentos necessários para realizar os experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa Araújo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pela ajuda prestada ao trabalho no I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Em especial, agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Anibal, e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa por todos os ensinamentos, dedicação, paciência, carinho, amizade, enfim, por toda orientação prestados para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pela oportunidade.

A Capes e a FAPESP pelo apoio financeiro.

E por último, agradeço a todos que de alguma maneira passaram pela minha vida e contribuíram para a construção desse trabalho.

*" Alice: Quanto tempo dura o eterno?*

*Coelho: Às vezes apenas um segundo."*

Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas



## RESUMO

### IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Erysipelothrix rhusiopathiae*: PROTEÇÃO EM UM MODELO MURINO

*Erysipelothrix rhusiopathiae* é um bacilo Gram-positivo causador da erisipela suína, que acarreta na perda e no mal desenvolvimento dos suínos. As vacinas existentes para a imunização contra a erisipela são formadas pela bactéria morta ou atenuada e segundo relatos na literatura, tem falhado em proporcionar proteção, acarretando na busca por outros componentes que possam formar uma nova vacina contra essa doença. A proteína de superfície SpaA de *E. rhusiopathiae* já foi relatada a induzir uma resposta imune do hospedeiro contra a bactéria, e a hsp70 DnaK foi demonstrada ser uma proteína antigênica da bactéria. Este trabalho avaliou a imunogenicidade e proteção induzida pelas proteínas recombinantes SpaA e DnaK de *E. rhusiopathiae* em modelo murino. O modelo foi delineado em 6 grupos de camundongos que receberam duas doses (subcutânea e intramuscular) de 40 µg e 100 µg das proteínas recombinantes. As proteínas foram avaliadas separadamente e em conjunto, comparadas com uma vacina comercial e a condição sem vacinação. Após 21 dias da última dose, os camundongos foram desafiados com uma cepa virulenta de *E. rhusiopathiae* e o soro foi coletado para avaliar os anticorpos, as células do sangue periférico foram contadas, e os tecidos do baço e do rim foram analisados quanto à presença de *E. rhusiopathiae* por contagem de colônias. Por último, foram realizadas duas curvas de sobrevivência, avaliando a proteção induzida pelas proteínas. Os resultados mostraram que os anticorpos IgG aumentaram no soro dos animais inoculados com as proteínas, os quais também tiveram a proliferação da bactéria reduzida nos baços e rins avaliados, e apresentaram um atraso significativo nos sintomas da doença nesse modelo de imunização. Esses resultados sugerem que, as proteínas DnaK e SpaA de *E. rhusiopathiae* apresentam potencial imunogênico e podem modular o desenvolvimento da doença, como avaliado no modelo murino.

Palavras-chave: Erisipela suína, Vacina, Imunização, SpaA, DnaK.

## ABSTRACT

### IMMUNOGENICITY OF RECOMBINANT PROTEINS FROM *Erysipelothrix rhusiopathiae*: PROTECTION IN A MURINE MODEL

*Erysipelothrix rhusiopathiae* is a Gram-positive bacillus that causes swine erysipelas, which leads to the loss and poor development of pigs. Existing vaccines for immunization against erysipelas are made up of killed or attenuated bacteria and, according to reports in the literature, have failed to provide protection, leading to the search for other components that could form a new vaccine against this disease. The surface protein SpaA of *E. rhusiopathiae* already has been reported to induce a host immune response against the bacteria, and hsp70 DnaK has been shown to be an antigenic protein of the bacteria. This work evaluated the immunogenicity and protection induced by the recombinant proteins SpaA and DnaK from *E. rhusiopathiae* in a murine model. The model was designed in 6 groups of mice that received two doses (subcutaneous and intramuscular) of 40 µg and 100 µg of recombinant proteins. The proteins were evaluated separately and together, compared with a commercial vaccine and with the no-vaccination condition. The proteins were evaluated separately and together, compared with a commercial vaccine and the without vaccination condition. 21 days after the last dose, mice were challenged with a virulent strain of *E. rhusiopathiae* and serum was collected to assess antibodies, peripheral blood cells were counted, and spleen and kidney tissues were analyzed for the presence of *E. rhusiopathiae* by colony count. Finally, two survival curves were performed, evaluating the protection induced by the proteins. The results showed that IgG antibodies increased in the serum of animals inoculated with the proteins, which also had bacterial proliferation reduced in the spleens and kidneys evaluated, and presented a significant delay in the symptoms of the disease in this immunization model. These results suggest that the DnaK and SpaA proteins from *E. rhusiopathiae* have immunogenic potential and can modulate the development of the disease, as assessed in the murine model.

Keywords: Swine erysipelas, Vaccine, Immunization, SpaA, DnaK.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia de uma cepa de <i>E. rhusiopathiae</i> .....	3
Figura 2. Hemorragias cutâneas em formato de losango distribuídas pelo corpo de um suíno infectado com <i>E. rhusiopathiae</i> .....	5
Figura 3. Endocardite valvular em um suíno causada por <i>E. rhusiopathiae</i> .....	6
Figura 4. Desenvolvimento da artrite reumatoide na fase crônica da erisipela suína. ...	7
Figura 5. Artrite debilitante e irreversível em um suíno em crescimento. ....	8
Figura 6. Delineamento experimental do primeiro ensaio de imunização. ....	28
Figura 7. Planejamento experimental do segundo ensaio de imunização.....	29
Figura 8. Desenho experimental para avaliação do efeito protetor e de imunogenicidade das proteínas rSpaA e rDnaK de <i>E. rhusiopathiae</i> em modelo murino. ....	31
Figura 9. Confirmação da transformação da ClearColi por eletroporação com os plasmídeos recombinantes.....	35
Figura 10. Análise por SDS-PAGE da expressão das proteínas rDnaK e rSpaA em ClearColi em meio LB, Dinamite e TB, variando as condições de expressão.....	37
Figura 11. Expressão das proteínas recombinantes rSpaA e rDnaK em ClearColi. ....	38
Figura 12. Análise de SDS-PAGE da purificação da proteína rDnaK por IMAC e eluição pela diminuição de pH.....	39
Figura 13. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína rDnaK por IMAC com eluição em gradiente de imidazol.....	40
Figura 14. Análise por SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular da proteína rDnaK.....	41
Figura 15. Análise de SDS-PAGE do teste de purificação por IMAC da proteína rSpaA solubilizada em cloridrato de guanidina 8M. ....	42
Figura 16. Análise de SDS-PAGE da purificação por IMAC da proteína rSpaA solubilizada em uréia 6 M.....	43
Figura 17. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína rSpaA por IMAC com eluição por diminuição do pH.....	44
Figura 18. <i>Western Blot</i> das proteínas recombinantes de SpaA e DnaK de <i>E. rhusiopathiae</i> com o anticorpo monoclonal de rato anti- <i>HisTag</i> .....	45

<b>Figura 19. <i>Western blot</i> das proteínas recombinantes purificadas rSpaA e rDnaK contra soros de suínos pré e pós-imunizados com a vacina comercial contra <i>E. rhusiopathiae</i>.</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 20. SDS-PAGE de 20 µg das proteínas rSpaA e rDnaK expressas pelas células ClearColi, após serem purificadas e concentradas.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 21. Primeiro ensaio de imunização e indução de anticorpos. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 22. Primeira curva de sobrevivência dos camundongos. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 23. Segundo ensaio de imunização. Títulos totais de IgG, IgG1 e IgG2a no sangue de camundongos isogênicos, 3 dias após a infecção. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 24. Morfologia e contagem de leucócitos no sangue de 4 camundongos isogênicos de todos os 6 grupos, 3 dias após a infecção.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 25. Biodistribuição dos órgãos rins e baço de animais heterogêneos, 3 dias após a infecção com 4000 células de <i>E. rhusiopathiae</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 26. Segunda curva de sobrevivência de camundongos.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> <i>Primers</i> para amplificação da sequência codificadora do gene <i>spaA</i> As bases sublinhadas correspondem aos nucleotídeos pertencentes aos sítios de restrição para <i>NcoI</i> e <i>HindIII</i> DNA.....	<b>21</b>
<b>Tabela 2.</b> Enzimas de restrição utilizadas para clonagem e digestão do inserto <i>dnaK</i> no vetor de expressão pET28a(+) .....	<b>22</b>
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio Terrific Broth (TB), utilizado para os cultivos.....	<b>22</b>
<b>Tabela 4.</b> Composição do meio Dynamite utilizado para os cultivos .....	<b>23</b>
<b>Tabela 5.</b> Tampões de solubilização dos corpos de inclusão .....	<b>24</b>
<b>Tabela 6.</b> Tampões de ligação e eluição específicos para a purificação das proteínas rDnaK e rSpaA, por cromatografia .....	<b>25</b>
<b>Tabela 7.</b> Componentes para o meio Feist modificado e otimizado.....	<b>30</b>
<b>Tabela 8.</b> Número de UFCs de <i>E. rhusiopathiae</i> NCTC 11002 de acordo com a $DO_{590nm}$ e com o tempo de crescimento em meio Feist modificado. Dados obtidos nesse trabalho .....	<b>30</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>Al(OH)<sub>3</sub></b>	<i>Hidróxido de Alumínio</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosina Trifosfato</i>
<b>BSA</b>	<i>Albumina de Soro Bovino</i>
<b>CEUA</b>	<i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>
<b>DEQ</b>	<i>Departamento de Engenharia Química</i>
<b>DGE</b>	<i>Departamento de Genética e Evolução</i>
<b>DL<sub>50</sub></b>	<i>Dose Letal Mediana</i>
<b>DMP</b>	<i>Departamento de Morfologia e Patologia</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<b>DO</b>	<i>Densidade Ótica</i>
<b>DQ</b>	<i>Departamento de Química</i>
<b>DTT</b>	<i>Ditiotreitol</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPM</b>	<i>Erro Padrão da Média</i>
<b>HCl</b>	<i>Ácido Clorídrico</i>
<b>His-Tag</b>	<i>Cauda de 6 Histidinas</i>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<i>Ácido Sulfúrico</i>
<b>HSP</b>	<i>Proteína do Choque Térmico</i>

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon-Gama</i>
<b>IMAC</b>	<i>Cromatografia de Afinidade de Íons Metálicos Imobilizados</i>
<b>IPTG</b>	<i>Isopropil-<math>\beta</math>-D-1-Tiogalactopiranosida</i>
<b>kb</b>	<i>Kilobase</i>
<b>KCl</b>	<i>Cloreto de Potássio</i>
<b>kDa</b>	<i>Quilodalton</i>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<i>Fosfato de Potássio Monobásico</i>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O</b>	<i>Fosfato de Potássio Dibásico Trihidratado</i>
<b>LB</b>	<i>Luria Bertani</i>
<b>LBBMA</b>	<i>Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada</i>
<b>LIDI</b>	<i>Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolissacarídeos</i>
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<i>Sulfato de Magnésio Heptahidratado</i>
<b>Mini-Prep</b>	<i>Mini Preparação de Plasmídeo</i>
<b>NaCl</b>	<i>Cloreto de Sódio</i>
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	<i>Carbonato de Sódio</i>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<i>Bicarbonato de Sódio</i>
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<i>Fosfato de Sódio Dibásico</i>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O</b>	<i>Fosfato Dissódico Dodecahidratado</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Padrões Moleculares Associados a Patógenos</i>

<b>PBS 1X</b>	<i>Tampão Phosphate Buffered Saline 1X</i>
<b>PCR</b>	<i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>
<b>PMSF</b>	<i>Fluoreto de Fenilmetilsulfonil</i>
<b>PPGGEv</b>	<i>Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular</i>
<b>qsp</b>	<i>Quantidade Suficiente Para</i>
<b>RNA</b>	<i>Ácido Ribonucleico</i>
<b>SDS</b>	<i>Dodecil Sulfato de Sódio</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio</i>
<b>SEC</b>	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
<b>SEM</b>	<i>Erro Padrão da Média</i>
<b>Spa</b>	<i>Surface protective antigen</i>
<b>SPF</b>	<i>Specific Pathogen Free</i>
<b>TAE</b>	<i>Tampão Tris-Acetato-EDTA</i>
<b>TB</b>	<i>Terrific Broth</i>
<b>TBST</b>	<i>Tampão Tris Buffered Saline+Tween20</i>
<b>TMB</b>	<i>3,3',5,5' Tetrametilbenzidina</i>
<b>Tris</b>	<i>Trizma</i>
<b>UFC</b>	<i>Unidade Formadora de Colônia</i>
<b>UFSCar</b>	<i>Universidade Federal de São Carlos</i>



**USP** *Universidade de São Paulo*

**UV** *Ultravioleta*

**v/v** *Volume por Volume*

**VC** *Volume da Coluna*

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1.	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .....	2
1.2.	Sintomas, Tratamento e Prevenção da Erisipela .....	4
1.3.	Fatores de Virulência .....	9
1.4.	Vacinas de Subunidade .....	11
1.5.	SpaA ( <i>Surface protective antigen A</i> ) Recombinante .....	12
1.6.	DnaK Recombinante.....	13
1.7.	ClearColi™ BI21 DE3.....	14
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1.	Objetivo Geral .....	17
2.2.	Objetivos Específicos .....	17
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>18</b>
3.1.1.	Bactérias e Estocagem.....	18
3.1.2.	Clones na Linhagem ClearColi: Vetores e Insetos Utilizados .....	18
3.1.3.	Obtenção e Manutenção dos Camundongos .....	19
3.1.4.	Soro de Suínos Vacinados e não Vacinados .....	19
3.1.5.	Preparação de Células Eletrocompetentes de ClearColi.....	19
3.1.6.	Transformação da ClearColi por Eletroporação .....	20
3.1.7.	Checação dos insetos do pET28a+SpaA e pET28a+DnaK em ClearColi.....	20
3.1.8.	Expressão Heteróloga das Proteínas SpaA e DnaK .....	22
3.1.9.	Procedimentos para Eletroforese e Quantificação de Proteínas .....	23
3.1.10.	Solubilização dos Corpos de Inclusão.....	24
3.1.11.	Purificação das Proteínas Recombinantes por Cromatografia de Afinidade .....	25
3.1.12.	<i>Western Blot</i> Contra as Proteínas Recombinantes .....	26
3.1.12.1.	<i>Western Blot</i> com Soro de Suínos .....	26
3.1.12.2.	<i>Western Blot</i> com anti-His-Tag .....	27

3.1.13.	Imunização dos Camundongos com as Proteínas Recombinantes .....	27
3.1.14.	Desafio in vivo com células de <i>E. rhusiopathiae</i> .....	29
3.1.15.	Eutanásia e Extração do Sangue e Soro de Camundongos .....	32
3.1.16.	Análise de Anticorpos IgG no Soro dos Camundongos.....	32
3.1.17.	Contagem Diferencial do Sangue Periférico de Camundongos .....	33
3.1.18.	Biodistribuição de <i>E. rhusiopathiae</i> nos Tecidos do Baço e Rim.....	33
3.1.19.	Curva de Sobrevivência dos Camundongos .....	33
3.1.20.	Análise Estatística .....	33
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.</b>	<b>Transformação da ClearColi com os Vetores Recombinantes.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.</b>	<b>Padronização das Condições de Expressão.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.</b>	<b>Purificação das Proteínas Recombinantes após Expressão Heteróloga</b> <b>.....</b>	<b>38</b>
4.3.1.	Purificação da Proteína rDnaK Expressa em ClearColi.....	38
4.3.2.	Purificação da Proteína rSpaA Expressa em ClearColi.....	41
<b>4.4.</b>	<b>Western Blot das Proteínas rSpaA e rDnaK.....</b>	<b>44</b>
4.4.1.	Anti-His-Tag .....	44
4.4.2.	Soro de Suínos.....	45
<b>4.5.</b>	<b>Preparação das Proteínas Recombinantes como Potenciais Vacinas</b> <b>de Subunidade.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6.</b>	<b>Primera Análise de Anticorpos IgG total no Soro dos Camundongos</b> <b>.....</b>	<b>48</b>
<b>4.7.</b>	<b>Primeira Análise da Curva de Sobrevivência dos Camundongos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.8.</b>	<b>Segunda Análise do Efeito Imunogênico da rSpaA e rDnaK contra <i>E.</i></b> <b><i>rhusiopathiae</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4.9.</b>	<b>Análise do Perfil das Células Sanguíneas Periféricas após Imunização</b> <b>.....</b>	<b>51</b>
<b>4.10.</b>	<b>Colonização do Baço e Rim pela <i>E. rhusiopathiae</i> após Imunização de</b> <b>Camundongos.....</b>	<b>53</b>
<b>4.11.</b>	<b>Segunda Análise do Efeito Protetor das Proteínas Recombinantes</b> <b>Contra a Erisipela .....</b>	<b>54</b>

<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína ocupa com destaque o primeiro lugar na preferência da população, dando-lhe o título de “a carne mais consumida no mundo”. Nos últimos 40 anos, o consumo de carne suína por parte da população mundial tem crescido na proporção de 1,52% ao ano. A China e a União Europeia são os maiores produtores de carne suína; o a China e o Japão são os maiores importadores e a União Europeia e os Estados Unidos são os maiores exportadores mundiais, sendo que o Brasil é o 4º maior produtor e também exportador de carne suína, responsável por 8% a 11% do comércio mundial (ABCS, 2014; FAO, 2017; USDA, 2022).

A suinocultura possui grande importância para a economia nacional, sendo que em 2012 com 39,3 milhões de cabeças de suínos, a produção no Brasil aumentou para 3450 milhões de toneladas de carne produzida, subindo para 4,4 milhões em 2022. Assim, para que a produção de carne seja grande e de qualidade para abastecer o mercado externo e interno, a saúde do rebanho tem que ser constantemente monitorada para que doenças infecciosas não causem grandes prejuízos econômicos e diminuição da exportação da carne suína (ABCS, 2014; USDA, 2022).

Se não identificadas e tratadas corretamente, doenças altamente contagiosas se alastram rapidamente no rebanho e podem causar alta mortalidade ou morbidade. Como exemplos dessas doenças que acometem rebanhos de suínos temos a peste suína africana, doenças respiratórias, circovirose, disenteria e erisipela suína (PELLIZA *et al.*, 2007; ABCS, 2014).

A erisipela suína possui ampla distribuição mundial, e juntamente com a pneumonia enzoótica e a disenteria suína está entre as enfermidades que mais causam prejuízos nas indústrias suínícolas de vários países da América do Norte; Europa; Ásia e Austrália. A erisipela em suínos pode também ser transmitida para humanos, contaminando quem cuida do manejo do rebanho nas fazendas (WANG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2016).

No Brasil, já foram isoladas por Oliveira e colaboradores (2005) das tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, 14,9 % de bactérias *Erysipelothrix* spp., sendo que 43% se alojavam em suínos não vacinados e 13% em vacinados. Pescador e colaboradores (2007) relataram casos de aborto suíno em prenhas infectadas por *E. rhusiopathiae*, através do isolamento do agente de lesões na pele e no pulmão dos

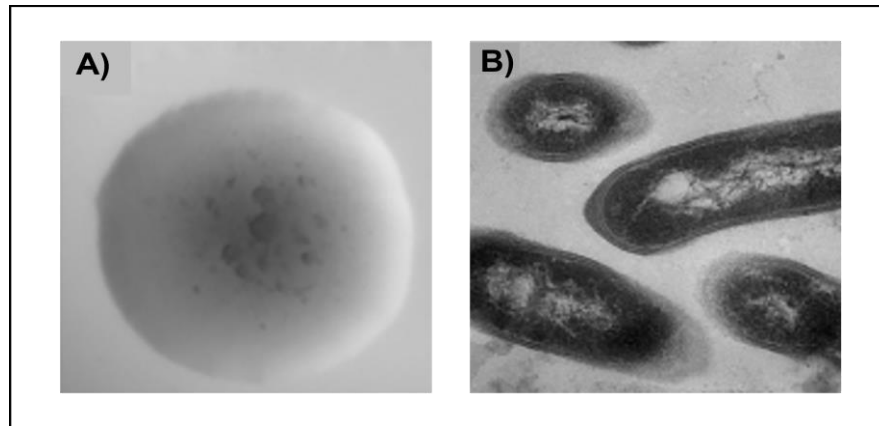
fetos. Ainda no Brasil, 150 *Erysipelothrix* spp. foram isoladas de suínos doentes e portadores por Coutinho e colaboradores (2011), as quais foram submetidas a sorotipagem e a testes moleculares.

Nos últimos anos, tem havido um aumento no número de surtos de *Erysipelothrix* spp. na Europa, nos Estados Unidos e no Japão, sendo que na Grã-Bretanha foram isolados 128 tipos dessa bactéria em suínos, entre 1989 a 2015 (MCNEIL *et al.*, 2017). Na China, apesar da relativa tranquilidade nas últimas três décadas, Kwok e colaboradores (2014) relataram o surgimento de surtos de erisipela suína em criadouros domésticos nos últimos anos, e ainda Tang e colaboradores (2016) isolaram várias cepas de *E. rhusiopathiae* no sul do país. No Japão, os casos de erisipela suína têm aumentado desde 2008, sendo que entre 2009 a 2011 foram reportados casos da doença em 11 cidades do país (OGAWA *et al.*, 2017; UCHIYAMA *et al.*, 2017).

### **1.1. *Erysipelothrix rhusiopathiae***

A erisipela suína é uma doença infecto-contagiosa causada pela bactéria *E. rhusiopathiae*, pertencente ao gênero *Erysipelothrix* spp. O microrganismo *E. rhusiopathiae* é um pequeno bacilo Gram-positivo, não-esporulante e anaeróbio facultativo, que foi primeiramente isolado do sangue de um roedor com septicemia por KOCH (1878), e depois descrito por LOEFFLER (1886) como o agente etiológico da erisipela suína (REBOLI & FARRAR, 1989; BROOKE & RILEY, 1999b).

*E. rhusiopathiae* é um organismo saprófito, encontrado na matéria orgânica em decomposição, podendo sobreviver por longos períodos no meio ambiente e ainda reter sua virulência durante meses. Sendo um organismo anaeróbio facultativo, pode crescer entre 15 e 44°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C e em pH entre 6,7 a 9,2. Colônias de *E. rhusiopathiae* são pequenas (0,1-0,5 mm de diâmetro); claras e circulares, e podem possuir aspecto liso ou áspero, sendo as colônias ásperas ligeiramente maiores com bordas irregulares (Figura 1) (BROOKE & RILEY, 1999b; WOOD, 1999).



**Figura 1. Morfologia de uma cepa de *E. rhusiopathiae*.** (A) Formação de uma colônia pequena e lisa em meio de cultivo sólido. (B) Morfologia da bactéria observada por micrografia eletrônica. Fonte: (LI *et al.*, 2016).

Essa bactéria pode infectar e ocasionalmente provocar doenças em diversas espécies, como crustáceos, roedores, aves, cães, carneiros, equinos e suínos, e também acarretar erisipelóide em humanos. É frequentemente encontrada em roedores e aves, porém seu maior reservatório é o suíno doméstico. Estima-se que dos suínos aparentemente saudáveis, 30% a 50% alojem a bactéria *E. rhusiopathiae* em suas tonsilas e em outros tecidos linfóides (BROOKE & RILEY, 1999b; WOOD, 1999; GARTRELL *et al.*, 2005; ASLANI *et al.*, 2015).

O gênero *Erysipelothrix*, classificado como membro da família *Erysipelotrichaceae*, é constituído atualmente por três espécies: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* e *E. inopinata*. As cepas desse gênero foram divididas em 26 diferentes sorotipos (tipos de antígenos presente na superfície celular) e em cepas tipo N (que não produzem anticorpos precipitantes), sendo que os sorotipos 1 e 2 foram separados em tipos A e B. Assim, *E. rhusiopathiae* apresenta os sorotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N; *E. tonsillarum* os sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22, 23, 24, 25 e 26; *Erysipelothrix* sp. estirpe 1 o sorotipo 13 e *Erysipelothrix* sp. estirpe 2 o sorotipo 18 (VERBARG *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Entre essas espécies, *E. rhusiopathiae* é a que causa maior perda econômica, principalmente para as indústrias de suínos, pois é a única espécie capaz de causar a doença, erisipela suína (TAKAHASHI *et al.*, 1987).

Esta distinção de sorotipo foi feita com base na hibridação DNA-DNA e com reação em cadeia da polimerase. O suíno é conhecido ser susceptível a pelo menos

15 dos 26 sorotipos descritos. Os sorotipos 1a e 1b estão associados a Erisipela aguda, enquanto o sorotipo 2 é frequentemente associado com a forma crônica da doença, ou seja, entre os 15 sorotipos de *E. rhusiopathiae*, os sorotipos 1a, 1b e 2 são as cepas mais importantes, que afetam a indústria suína (WOOD, 1999; IMADA *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

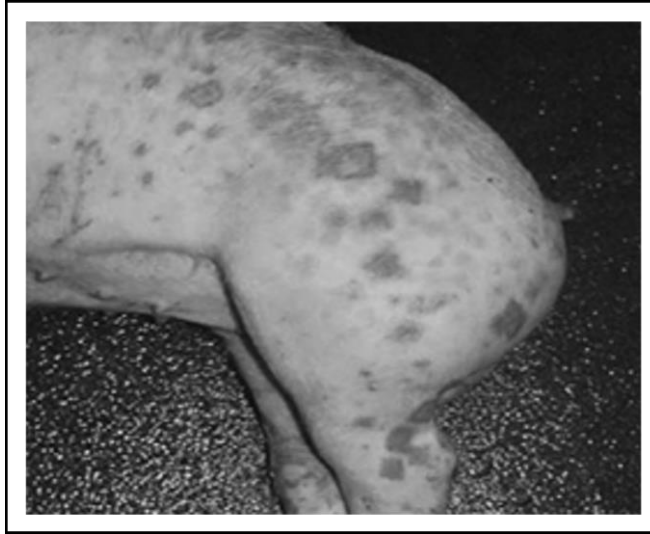
Na infecção por *E. rhusiopathiae*, a imunidade tanto humoral quanto a mediada por células desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro, porém a imunidade humoral possui um papel crítico, já que o tratamento com anti-soro proporciona um controle da doença (SHIMOJI, 2000). Polimorfonucleados (PMNs) e macrófagos facilmente eliminam bactérias *E. rhusiopathiae* opsonizadas com soro imune, porém a atividade protetora desse soro imune é processada somente pela opsonização de anticorpos IgG, e não IgM, que promovem uma alta queima oxidativa dentro das células fagocíticas (SHIMOJI *et al.*, 1994; SHIMOJI *et al.*, 1996). Já na imunidade mediada por células, foi demonstrada uma significativa proliferação de células esplênicas de camundongos em resposta a antígenos de *E. rhusiopathiae* (SHIMOJI *et al.*, 1998).

## **1.2. Sintomas, Tratamento e Prevenção da Erisipela**

A erisipela suína usualmente é contraída através de ferimentos na pele ou do consumo de água e comida contaminadas pela bactéria *E. rhusiopathiae*. A infecção pode se manifestar em suínos de diversas idades, porém suínos com menos de 8 semanas são menos susceptíveis a infecção devido a ingestão do colostro, que possui alta concentração de IgG (SHIMOJI, 2000; IMADA *et al.*, 2003). Esta doença tende a ser oportunista, com grandes surtos após eventos de estresse em animais de cativeiro, o que pode acarretar em septicemias caracterizadas como agudas, subagudas ou lesões crônicas (KUTZ *et al.*, 2015).

A forma aguda é caracterizada por septicemia, hipertermia de 40 a 42°C, inapetência, depressão geral, abortos em porcas em gestação, infertilidade temporária em machos, e principalmente pelo surgimento de hemorragias cutâneas, púrpuras ou avermelhadas, em formato de losangos em qualquer lugar do corpo a partir do segundo dia de infecção (Figura 2) (REBOLI & FARRAR, 1989; WOOD, 1999).





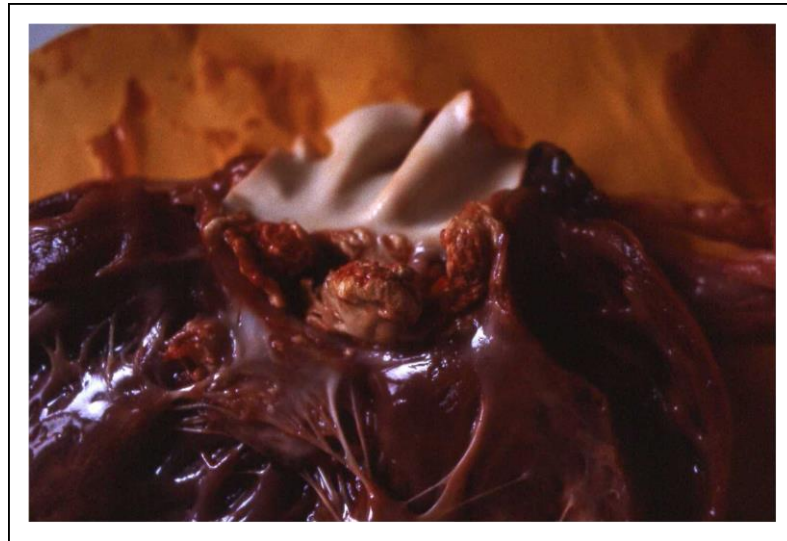
**Figura 2. Hemorragias cutâneas em formato de losango distribuídas pelo corpo de um suíno infectado com *E. rhusiopathiae*.** Essas lesões são a principal característica da erisipela suína e aparecem no estágio agudo da doença. Fonte:(WOOD, 1999).

Essas manifestações podem sumir em quatro a sete dias, ou progredir rapidamente e originar áreas necrosadas sujeitas a infecções secundárias, ocasionando no óbito do animal se não ocorrer administração de medicamentos. Ainda, suínos que se encontram na forma aguda da erisipela suína se tornam uma grande fonte de contaminação da doença, já que eliminam a bactéria *E. rhusiopathiae* pela urina, fezes, saliva e secreções nasais, podendo sobreviver no solo ou esterco por 6 meses ou mais (WOOD, 1999; NADIS, 2023).

Na forma subaguda, os animais apresentam sintomas mais brandos, com poucas lesões na pele e febre branda, o que acarreta muitas vezes na falta da percepção, e conseqüentemente do tratamento da doença (REBOLI & FARRAR, 1989; WOOD, 1999).

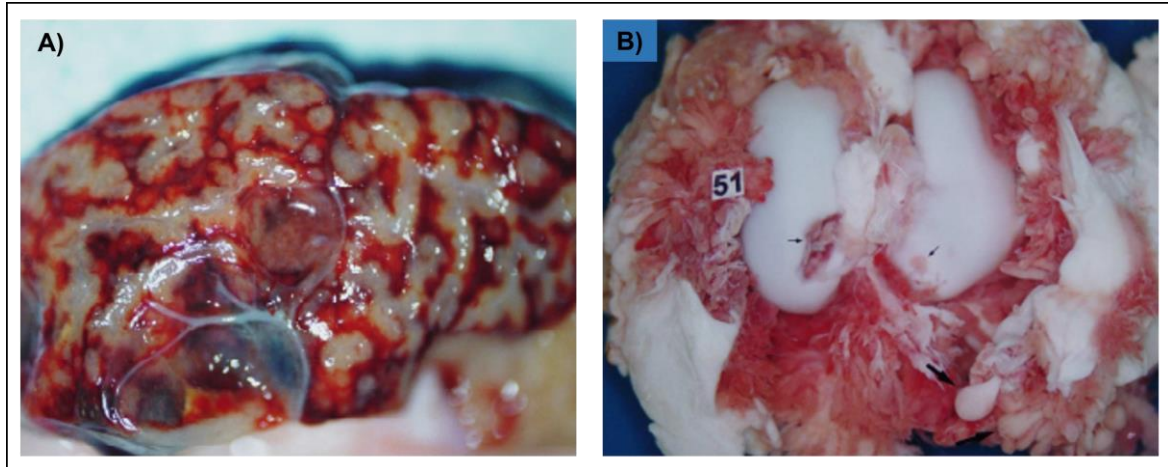
Já a forma crônica da doença, geralmente segue de uma infecção aguda ou subaguda, onde podem ocorrer alterações patológicas destrutivas autossustentáveis nas válvulas cardíacas e articulações, produzindo endocardite e artrite, respectivamente. A proliferação de tecido granular nas válvulas cardíacas causa endocardite vegetativa com insuficiência cardíaca (Figura 3), essas lesões valvulares iniciam com inflamação vascular e infartos no miocárdio resultante da obstrução pelas bactérias (FRANZ *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2010). Já a formação da artrite depende da ativação persistente de macrófagos causada por linfócitos T estimulados

continuamente nas articulações e promove aumento dos linfonodos mediais e axilares, sendo que alguns suínos apresentam engrossamento das articulações dos membros locomotores a partir da terceira semana após a infecção, sentindo dor ao se movimentarem (Figura 4) (RENZ *et al.*, 1989; ALBERTON *et al.*, 2003; OLIVEIRA, S.J., 2009).



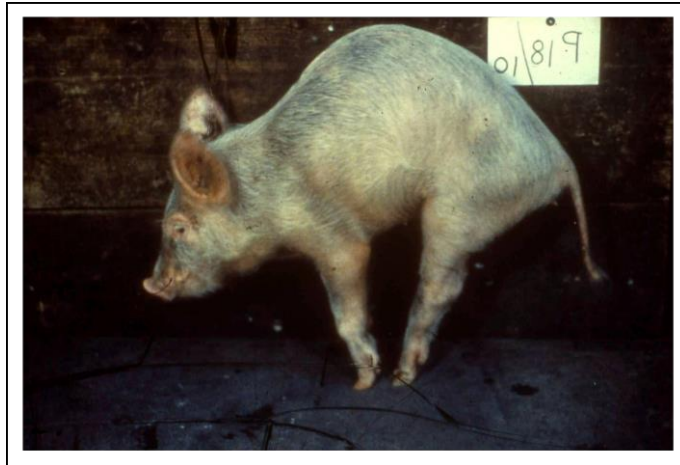
**Figura 3. Endocardite valvular em um suíno causada por *E. rhusiopathiae*.** Lesão em formato de “couve-flor” adquirida no estágio crônico de erisipela suína, podendo levar a falha cardíaca. Fonte: (NADIS, 2023).

A artrite por erisipela é uma das mais importantes formas de apresentação clínica do ponto de vista econômico, pois se apresenta de forma proliferativa e não supurativa, que pode progredir no suíno vivo mesmo na ausência da bactéria, ocorrendo perdas por diminuição no desenvolvimento dos animais, além das perdas no frigorífico pela desvalorização da carcaça (Figura 5) (WOOD, 1999; OLIVEIRA, S.J., 2009).



**Figura 4. Desenvolvimento da artrite reumatoide na fase crônica da erisipela suína.** (A) Linfonodo ilíaco medial reativo de suíno com artrite causada pela *E. rhusiopathiae*. (B) Superfície articular do fêmur de suíno com artrite causada pela bactéria, onde podemos observar a membrana sinovial com acentuada hipertrofia e com vilosidades dilatadas (setas maiores) e a presença de erosão na cartilagem articular (setas menores). Fonte: (ALBERTON *et al.*, 2003).

A infecção por *E. rhusiopathiae* em suínos deve ser diferenciada de outras infecções que possuam sintomas parecidos e acarretem em um diagnóstico incorreto, como a infecção causada pela *Salmonella choleraesuis* (causa peste suína clássica), e pelo *Streptococcus suis* (pode ocasionar artrite e endocardite). O diagnóstico laboratorial oportuno e preciso da erisipela é importante e pode ser efetuado através do isolamento da bactéria *E. rhusiopathiae* de tecidos do suíno doente, como os do coração, pulmões, fígado, baço, rins, articulações e pele, e ainda de amostras de sangue e fezes, utilizando-se meio de cultura seletivo, já em casos crônicos, é necessário o preparo prévio com caldo de cultura seletiva (BROOKE & RILEY, 1999a; WOOD, 1999; OLIVEIRA, S.J., 2009). O teste sorológico de ELISA também pode ser utilizado para se obter o diagnóstico de erisipela, bem como testes moleculares que foram desenvolvidos para a detecção rápida de *Erysipelothrix* spp., como ensaios de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) convencionais com genes específicos (MAKINO, S. *et al.*, 1994).



**Figura 5. Artrite debilitante e irreversível em um suíno em crescimento.** A artrite pode deixar o animal manco e pode também afetar as articulações da coluna, produzindo um aspecto arqueado. Fonte: (NADIS, 2023).

A base do tratamento das infecções causadas por *E. rhusiopathiae* é a antibioticoterapia, como penicilina e cefalosporina, porém esses medicamentos só se mostram efetivos na fase aguda da doença, não apresentando resultados satisfatórios na fase crônica, e ainda, o uso constante de um antibiótico pode selecionar bactérias resistentes e menos sensíveis a essa droga, como já ocorreu com a eritromicina, dificultando o tratamento (REBOLI & FARRAR, 1989; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Assim, para prevenir o surgimento de cepas resistentes; evitar uma grande perda de suínos e desvalorização da carne após o abate, a prevenção da erisipela por meio do uso de vacinas tem se mostrado a melhor alternativa para o controle dessa doença (TAKAHASHI *et al.*, 1987; YAMAMOTO *et al.*, 2001).

As vacinas comerciais existentes para porcos e perus consistem em bacterinas de células mortas; lisados; estirpes mortas ou vivas atenuadas de *E. rhusiopathiae*. As porcas normalmente devem ser vacinadas de 3-4 semanas antes do parto e os porcos devem ser vacinados a cada 6 meses. Geralmente, a vacinação pode induzir imunidade por três a cinco meses, e a segunda dose (*booster*) pode aumentar a duração em até um mês, porém a eficácia é variável e depende do tipo de estirpes utilizadas na vacina, sendo que as do sorotipo 2 estão sendo amplamente utilizadas por promoverem melhor proteção contra cepas mais virulentas (GROSCHUP & TIMONEY, 1990; SWAN & LINDSEY, 1998; WANG *et al.*, 2010).

As vacinas atualmente utilizadas são capazes de controlar a doença, porém, nos últimos anos alguns países já relataram surtos de erisipela suína e também o desenvolvimento da doença em suínos mesmo após a imunização (IMADA *et al.*, 2004; GERBER *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos, no verão de 2001, os casos relatados de erisipela aumentaram em porcos vacinados e não vacinados, e em 2010 houve surtos da doença relatados em 6 sítios operacionais de suínos (BENDER *et al.*, 2010; OPRIESSNIG *et al.*, 2020).

Um surto de erisipela suína aguda foi relatado no leste da China, no qual sete outras cepas de *E. rhusiopathiae* foram isoladas desde o verão de 2013 (ZOU *et al.*, 2015). E no Japão, foram relatados aproximadamente 2.000 casos de erisipela em suínos por ano, com surtos esporádicos da doença relatados de 2008 a 2019 causados principalmente pela cepa do tipo Met-203, sugerindo que essa cepa pode estar disseminada no país (TO *et al.*, 2012; UCHIYAMA *et al.*, 2014; MORIMOTO *et al.*, 2021).

Devido à alta frequência de ocorrência desses surtos, existe a suspeita de que a vacina composta pela bactéria atenuada possa ter sua virulência revertida, como na Austrália, que entre 1995 e 1998, quatro estados experimentaram possível falha da vacina em 34 rebanhos de suínos (EAMENS *et al.*, 2006). Logo, é sugerido que a vacinação pode levar ao aumento das lesões artríticas por induzir o estado de hipersensibilidade pelo contato com o microrganismo, porém é difícil comprovar que a cepa presente na vacina foi a mesma responsável pelo surto de doença, portanto, vacinas compostas por partes antigênicas do agente patogênico podem ser uma alternativa promissora para fornecer maior proteção e segurança (IMADA *et al.*, 2004; NEUMANN *et al.*, 2009).

### **1.3. Fatores de Virulência**

Vários fatores de virulência do organismo *E. rhusiopathiae* têm sido sugeridos, porém relativamente pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência natural e fisiopatogenia das infecções por *E. rhusiopathiae*. A patogênese da infecção por essa bactéria ainda não é totalmente compreendida, porém podemos afirmar que a fase inicial da erisipela suína consiste no edema de células endoteliais e degenerações envolvendo os capilares e vênulas da maioria dos órgãos do suíno. Esses capilares e

vênulas ficam então congestionados e danificados, exibindo hemorragia e infiltração perivascular de células mononucleares, que muitas vezes contêm microtrombos e êmbolos bacterianos (BROOKE & RILEY, 1999b; SHIMOJI, 2000; ZHU *et al.*, 2017).

*E. rhusiopathiae* produz enzimas que têm mostrado relação com a sua patogenicidade, por exemplo, a enzima neuraminidase que pode se envolver no processo de aderência da bactéria a células do hospedeiro, e em processos anti-fagocíticos (NAKATO *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 2010). Também há a enzima hialuronidase, que apesar de ser um fator de dispersão (facilita a disseminação de patógenos pelos tecidos), não apresenta estar associada a virulência dessa bactéria (SHIMOJI *et al.*, 2002b).

Outro fator de virulência do *E. rhusiopathiae* está associado, pelo menos em parte, à resistência ao processo de fagocitose por PMNs e macrófagos, sendo que essa capacidade está intimamente relacionada com a presença de uma cápsula polissacarídica na sua superfície celular (SHIMOJI *et al.*, 1998; SHIMOJI, 2000). Shimoji e colaboradores (1994) concluíram que sem a presença da cápsula as cepas de *E. rhusiopathiae* se tornaram avirulentas e facilmente fagocitadas. Ainda em outro trabalho, Shimoji e colaboradores (1996) demonstraram que cepas de *E. rhusiopathiae* capsuladas não induziram uma resposta de explosão oxidativa por macrófagos adequada, e ainda puderam sobreviver e replicar dentro de macrófagos quando ingeridos, enquanto as cepas que não possuíam a capsula induziram uma forte explosão oxidativa, ocasionando na eliminação dessas cepas por macrófagos.

Proteínas de adesão como RspA e RspB, já identificadas em *E. rhusiopathiae*, podem contribuir na virulência dessa bactéria, já que a adesão a células do hospedeiro é o primeiro passo da infecção (SHIMOJI *et al.*, 2003). Várias proteínas de superfície já foram descritas e também podem estar envolvidas com a virulência dessa bactéria, como o antígeno de 64-66 kDa, que está localizado na superfície celular do organismo e é menos expresso em cepas com moderada ou baixa virulência do que em cepas altamente virulentas (GALAN & TIMONEY, 1990; SATO *et al.*, 1995).

A chaperona molecular hsp70 conhecida como DnaK, é uma proteína de estresse térmico, que além de proteger a bactéria de estresses térmicos e químicos no interior de macrófagos também é capaz de ativar a imunidade do hospedeiro, sendo considerado um antígeno promissor (PARTRIDGE *et al.*, 1993; SUZUE &

YOUNG, 1996). O antígeno protetor SpaA, é também uma proteína de superfície da bactéria *E. rhusiopathiae*, e é considerado o antígeno com melhor potencial para a concepção de vacinas protetoras para erisipela suína (MAKINO, S. *et al.*, 1998; BORRATHYBAY *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2017).

#### 1.4. Vacinas de Subunidade

O sistema imunológico reconhece um agente invasor através de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), que são características de patógenos que estimulam a imunidade inata. Dentre eles podem ser citados ácidos nucleicos, enzimas, componentes da parede celular e fatores de virulência (ABBAS *et al.*, 2017).

Uma infecção pode induzir o desenvolvimento de uma doença autoimune através de um mecanismo denominado mimetismo molecular. De acordo com essa hipótese determinantes antigênicos dos microrganismos podem ser reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro como sendo semelhantes aos seus próprios, por isso, devido a uma semelhança estrutural, anticorpos e células T auto reativas não só destroem o agente invasor, mas também atacam o tecido do hospedeiro (WUCHERPFENNIG, 2001; TISHLER & SHOENFELD, 2004).

As vacinas usadas atualmente na prevenção da erisipela suína são compostas pela bactéria morta ou atenuada e contribuem para a diminuição de ocorrências da doença, porém possuem um curto período de imunização o que faz com que a frequência da vacinação ao longo da vida do suíno seja alta. Devido a constante exposição do suíno a *E. rhusiopathiae* (morta ou atenuada) através da vacinação, há chances da indução de uma artrite reumatoide que é um sintoma da fase crônica dessa doença. Essa indução ocorre devido a essa vacina causar uma infecção mínima, que no caso da artrite reumatoide pode levar a um quadro clínico incontrolável que causa grande prejuízo por condenação da carne (WUCHERPFENNIG, 2001; TISHLER & SHOENFELD, 2004; NEUMANN *et al.*, 2009).

Assim, devido a relatos da falha da vacina em proporcionar proteção contra os sintomas mais prejudiciais da erisipela suína, muitas pesquisas que envolvem potenciais imunobiológicos contra *E. rhusiopathiae* têm sido realizadas e dentre elas, se destacam o desenvolvimento de vacinas de subunidade ou DNA (IMADA *et al.*, 2004; NEUMANN *et al.*, 2009).

Vacinas de subunidade são formadas por frações acelulares purificadas do patógeno, como proteínas e polissacarídeos, capazes de induzir a resposta imune no hospedeiro mesmo sem a presença íntegra do agente infeccioso. As subunidades de origem patogênica são seguras para uso como vacinas, desde que o processo de extração ou o método de desintoxicação resulte em um produto puro, e ainda possuem a vantagem de minimizar outros efeitos no organismo por incluir somente antígenos essenciais para a indução da proteção (LILJEQVIST & STAHL, 1999).

O antígeno protetor de superfície (Spa) A é considerado um dos maiores antígenos protetores da bactéria *E. rhusiopathiae*, possuindo grande importância por contribuir com a virulência do organismo e também sendo responsável por induzir uma alta resposta do sistema imune de um hospedeiro, com alta imunogenicidade. A SpaA é capaz de induzir proteção em animais, por isso vários testes para a produção de vacina têm sido efetuados com essa proteína, no intuito de aumentarem seu grau de proteção e sua estabilidade dentro do hospedeiro (MAKINO, S. *et al.*, 1998; SHIMOJI *et al.*, 2002a).

### **1.5. SpaA (Surface protective antigen A) Recombinante**

Proteínas de superfície Spa possuem aproximadamente 64 a 66 kDa e desempenham um papel específico na virulência da bactéria *E. rhusiopathiae* e são conhecidas por provocar uma alta produção de anticorpos, estando classificadas em SpaA; SpaB e SpaC, onde a proteína SpaA tem demonstrado ser um dos principais antígenos de *E. rhusiopathiae* (BENDER *et al.*, 2010; HARADA *et al.*, 2012).

Um único tipo de proteína Spa, a SpaA foi encontrada em diversos sorotipos de *E. rhusiopathiae*, sendo que os sorotipos obtidos de tecidos de porcos doentes foram 1a, 2 e 21; já de amostras ambientais foram os sorotipos 1a, 1b, 2, 6, 9, 12 e 21 e em estirpes vacinais foram identificados os sorotipos 1a e 2. O que reforça relatos do antígeno SpaA ser altamente conservado em sorotipos mais frequentemente associados à erisipela suína clínica (BENDER *et al.*, 2010; INGEBRITSON *et al.*, 2010).

A proteína SpaA na sua forma madura é segregada a partir da bactéria para depois se ligar à superfície das células bacterianas através da região C-terminal, constituída por oito repetições de 20 aminoácidos cada, mas apesar dessa região



atuar como ancora na ligação do antígeno SpaA à superfície de várias bactérias Gram-positivas (*Listeria* ssp. e *Staphylococcus* ssp.), não é considerada uma região associada com a imunidade protetora contra infecção por *E. rhusiopathiae*, em vez disso, a unidade que proporciona imunidade se localiza na região hipervariável N-terminal da SpaA (MAKINO, S. *et al.*, 1998; MAKINO, S. I. *et al.*, 2000; CHEUN *et al.*, 2004).

A região C-terminal da SpaA é muito semelhante às proteínas de ligação à colina de *Streptococcus pneumoniae*, que podem se ligar a resíduos de colina do ácido teicóico ou do ácido lipoteicóico da parede celular. Estudos recentes demonstraram que a SpaA desempenha importante função na adesão de *E. rhusiopathiae* a células hospedeiras e também inibição da eliminação da bactéria mediada pelo sistema complemento (HARADA *et al.*, 2012; BORRATHYBAY *et al.*, 2015).

Vários ensaios de proteção utilizando anticorpos anti-SpaA já foram realizados, proporcionando proteção a animais, como camundongos e suínos, diante de cepas altamente virulentas de *E. rhusiopathiae*, e ainda conseguiram proporcionar uma alta indução da produção de anticorpos IgG nesses animais. Assim, o antígeno SpaA pode ser considerados um bom candidato para a construção de uma vacina de subunidade para erisipela suína (IMADA *et al.*, 1999; CHEUN *et al.*, 2004; BORRATHYBAY *et al.*, 2015).

### **1.6. DnaK Recombinante**

A proteína DnaK (Hsp70) é uma chaperona molecular altamente conservada, essencial para a proteção e resposta de muitos organismos ao estresse térmico. Essa proteína é uma das proteínas de estresse mais bem caracterizadas, promovendo translocação e dobramento adequados das proteínas e catalisando a hidrólise de Adenosina Trifosfato (ATP). Além disso, sua atividade de ATPase está localizada em um domínio N-terminal e a atividade de ligação ao peptídeo em um domínio C-terminal (KRSKA *et al.*, 1993; PARTRIDGE *et al.*, 1993).

A DnaK é considerada um importante antígeno de *Escherichia coli* por ser necessária para a resistência do patógeno dentro do ambiente estressante promovido pelas células de defesa do hospedeiro, como oxidação e baixo pH (SUZUE & YOUNG, 1996). Em *E. rhusiopathiae*, a DnaK parece desempenhar uma função semelhante,

podendo então ser considerada como um potencial fator de virulência dessa bactéria. Além disso, a DnaK pertence à família das hsp70 (proteínas mais dominantes entre as de choque térmico), que podem ser consideradas como proteínas antigênicas de muitas bactérias, pois são capazes de ativar a imunidade mediada por células B e T do hospedeiro e também podem atuar como adjuvantes (PARTRIDGE *et al.*, 1993; ROMAN & MORENO, 1996).

Quando utilizadas como vacinas de subunidades, verificou-se que as HSPs derivadas de patógenos bacterianos e fúngicos, podem ser utilizados como adjuvantes, imunomoduladores e vacinas subunitárias contra doenças infecciosas (SUZUE & YOUNG, 1996; BOLHASSANI & RAFATI, 2008). Ainda, estudos realizados por Kim e colaboradores (1998) demonstraram que a DnaK de *Streptococcus pneumoniae* pode vir a ser um bom candidato para a produção de vacinas contra infecções por *Streptococcus*.

A proteína DnaK de *E. rhusiopathiae* foi identificada previamente como uma proteína imunogênica no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada – LBBMA do Departamento de Genética e Evolução, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Marques Novo Mansur. Por meio de abordagem imunoproteômica, o subproteoma de proteína extracelulares desse patógeno foi analisado em busca de proteínas potencialmente antigênicas, candidatas a vacinas de subunidade. A metodologia utilizada foi *Serological Proteome Analysis - SERPA* (LE MARECHAL *et al.*, 2011; PITARCH *et al.*, 2011), a qual é baseada na técnica de *Western Blot* de géis de eletroforese bidimensionais- 2D. Assim, proteínas extracelulares de *E. rhusiopathiae* foram separadas por eletroforese bidimensional e o soro de animais previamente imunizados contra a bactéria foram utilizados no *Western blot*, sendo as proteínas anticorpo-reativas isoladas para identificação por espectrometria de massas (MONTEIRO, 2015). Esse trabalho indicou que a DnaK, uma das proteínas identificadas, pode ser candidata em potencial para proporcionar imunidade ao hospedeiro, como possível componente vacinal.

### **1.7. ClearColi™ BI21 DE3**

*E. coli* BL21 (DE3) é uma cepa utilizada para a produção de proteínas recombinantes, pois possui o gene da RNA polimerase do fago T7 sob controle do

operon Lac, sendo capaz de expressar genes clonados em sequência ao promotor T7, em plasmídeos de expressão heteróloga. Porém, uma limitação desse método de expressão de proteínas é a liberação de endotoxinas conhecidas como lipopolissacarídeos (LPS), presentes na *E. coli* (JEONG *et al.*, 2015; LUCIGEN, 2016).

Os LPS são um importante componente estrutural da membrana externa de microrganismos gram-negativos. Sua estrutura básica consiste em três partes: lipídio A; núcleo de oligossacarídeos e antígeno “O” (polímero de oligossacarídeos de repetição) (RAETZ & WHITFIELD, 2002). Os LPS são endotoxinas que promovem uma forte resposta do sistema imunitário de animais saudáveis, ativando macrófagos e células B. Essa estimulação celular proporcionada pelos LPS causa problemas aos protocolos de expressão e purificação de proteínas expressadas por *E. coli*, pois acabam como parte do produto final e podem interferir potencialmente com as aplicações da proteína expressada, como por exemplo na composição de vacinas (REZANIA *et al.*, 2011).

Vários métodos de extração dos LPS têm sido utilizados, porém são dispendiosos e extensos e podem afetar a bioatividade e o rendimento final da concentração da proteína produzida na forma recombinante. Como exemplo de métodos para a remoção das endotoxinas temos a ultrafiltração, surfactantes, troca de ânions, carvão ativado e a cromatografia. Sendo assim, o desenvolvimento de ferramentas para a eliminação de LPS da membrana externa de *E. coli* parece ser uma via tecnicamente mais vantajosa para a produção e purificação de proteínas (LUCIGEN, 2016).

Atualmente, a Lucigen, em parceria com a *Research Corporation Technologies* desenvolveu uma nova linha de células competentes de *E. coli* denominadas ClearColi™. Estas células foram geneticamente modificadas para bloqueio da produção de LPS, por meio da incorporação de sete deleções genéticas ( $\Delta$ gutQ  $\Delta$ kdsD  $\Delta$ lpxL  $\Delta$ lpxM  $\Delta$ pagP  $\Delta$ lpxP  $\Delta$ eptA). Assim, essas modificações conseguiram remover os gatilhos de resposta imunológica associados ao LPS, enquanto a bactéria ainda mantém a viabilidade e a capacidade de expressar proteínas recombinantes para ensaios baseados em células imunes, o que também torna o processo de purificação mais simples; viável e livre de toxinas (LUCIGEN, 2016).

Sendo assim, essa nova linha de células desenvolvida pode ser de grande utilidade, principalmente na expressão de proteínas destinadas a compor vacinas de subunidade, já que quanto menos contaminantes as proteínas recombinantes apresentarem melhor será a estimulação da imunogenicidade.

Este estudo utiliza a cepa ClearColi para expressar as proteínas rSpaA e rDnaK de *E. rhusiopathiae*, livre de LPS presentes na membrana de *E. coli* BL21 (DE3) normalmente utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes. Esse método possibilita uma avaliação mais precisa da eficácia protetora dessas proteínas contra a erisipela suína em camundongos, pois os LPS não contaminam as proteínas expressas para a imunização dos animais e por isso o sistema imune não reconhece essa endotoxina que poderia vir a modificar a resposta imunológica avaliada, reagindo somente as proteínas estudadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune protetora induzida em modelo murino contra *E. rhusiopathiae*, de vacina de subunidade constituída pelas proteínas recombinantes SpaA (rSpaA) e DnaK (rDnaK) de *E. rhusiopathiae*, em conjunto ou separadas, comparativamente à vacina comercial SUIVAC® ERY-IN (Dyntec).

### 2.2. Objetivos Específicos

- Expressar e purificar as proteínas rSpaA e rDnaK na bactéria ClearColi™ (Lucigen), em quantidade e qualidade suficiente para a imunização dos camundongos.
- Analisar a produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a nos animais imunizados e posteriormente infectados pela *E. rhusiopathiae*.
- Avaliar o perfil celular no sangue de animais imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com *E. rhusiopathiae*.
- Analisar a biodistribuição bacteriana nos rins e baços dos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes, frente ao desafio com a bactéria.
- Comparar a capacidade protetora das vacinas compostas pelas rSpaA e rDnaK (juntas e separadas), com à vacina comercial (microrganismo inativado), após desafio com *E. rhusiopathiae*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais e Métodos

##### 3.1.1. Bactérias e Estocagem

**ClearColi™ BI21 DE3 (ClearColi):** Os vetores pET28a(+) (Novagen) contendo as sequências codificadoras de *E. rhusiopathiae* de SpaA (DA SILVA *et al.*, 2012) e DnaK (MORAES, 2015) foram transformadas em células eletrocompetentes de ClearColi™. Após a validação dos clones positivos, foram preparadas alíquotas de 500 µl da suspensão bacteriana para estoque permanente a -80°C em glicerol 20%. A linhagem ClearColi não transformada foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Zangirolami do Departamento de Engenharia Química (DEQ/UFSCar) também em 500µL de suspensão, estocada em nitrogênio líquido.

***Erysipelothrix rhusiopathiae*:** Foram utilizadas células de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 pertencentes ao sorotipo 1a (a partir da qual os genes de interesse *spaA* e *dnaK* foram anteriormente clonados), para desafiar os camundongos no ensaio de proteção. Para armazenamento, alíquotas de 1,5 ml da suspensão bacteriana foram estocadas em glicerol 20%, a -80°C. A linhagem foi cedida pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva e pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Cristina Zangirolami do Departamento de Engenharia Química (DEQ/UFSCar).

##### 3.1.2. Clones na Linhagem ClearColi: Vetores e Insertos Utilizados

**pET28a+SpaA:** o clone foi cedido pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva (DEQ/UFSCar). O inserto foi amplificado por PCR a partir da sequência codante que traduz 342 aminoácidos da parte N-terminal da proteína SpaA (IMADA *et al.*, 1999) de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002; depois de sequenciado, o inserto foi clonado no vetor de expressão pET28a(+) como descrito em Silva e colaboradores (2012).

**pET28a+DnaK:** a proteína DnaK de *E. rhusiopathiae* foi detectada como sendo potencialmente imunogênica em uma análise imunoproteômica utilizando o soro de suínos imunizados com uma vacina celular comercial (MONTEIRO, 2015). O gene codante da DnaK foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 e após checagem da sequência foi inserido no vetor de expressão pET28a(+) (MORAES, 2015). O clone para expressão da DnaK de *E. rhusiopathiae* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. M. Teresa M. Novo Mansur (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada – LBBMA, Departamento de Genética e Evolução – DGE, UFSCar).

### 3.1.3. Obtenção e Manutenção dos Camundongos

Camundongos fêmeas SPF (*Specific Pathogen Free*) da linhagem BALB/c (isogênica), com aproximadamente quatro semanas de idade e pesando 20 g, foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto e mantidos em ciclo claro-escuro de 12:12 horas no biotério do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (LIDI/DMP/UFSCar), com livre acesso a água e ração. Toda a experimentação animal foi realizada no LIDI/DMP/UFSCar no período vespertino, e os protocolos experimentais foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), e atestado pela mesma sob protocolos nº. 1952060618 e nº.1247201120.

### 3.1.4. Soro de Suínos Vacinados e não Vacinados

A vacinação de suínos e a coleta sérica foram realizados anteriormente pela Cripion Biotechnology (Andradina, Brasil) para a realização da imunoproteômica de *E. rhusiopathiae* (MONTEIRO, 2015), os soros foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Mansur (LBBMA/DGE/UFSCar) para os ensaios de *Western blot* deste trabalho. A obtenção dos soros na referida empresa foi realizada conforme descrito a seguir. Três suínos achos adultos tiveram seu soro coletado antes da aplicação da vacina (dia 0) e logo depois os animais foram imunizados com a vacina comercial Farrowsure® B Gold (Pfizer), composta de *E. rhusiopathiae* viva e atenuada. Vinte e

um dias após a imunização, o soro foi coletado (dia 21) e os animais foram novamente imunizados com uma segunda dose da vacina. A última coleta de soro dos animais foi realizada 15 dias após a segunda imunização (dia 36).

### **3.1.5. Preparação de Células Eletrocompetentes de ClearColi**

Inicialmente foi feito um inóculo das células ClearColi em meio de cultivo Luria Bertani (LB) (Sigma), sendo o cultivo incubado a 37°C a 250 rpm. Após essa etapa, alíquotas da cultura foram diluídas em meio fresco de modo a obter densidade ótica ( $DO_{595nm}$ ) de 0,1, e a partir daí incubadas novamente nas mesmas condições de crescimento até atingirem  $DO$  de 0,5. Em seguida, foi feita centrifugação de 100 ml da cultura a 7000 x  $g$  por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez com 50 ml de água ultrapura Milli-Q estéril gelada, para logo em seguida ser centrifugado. Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 ml de solução de glicerol 10% (v/v) estéril gelado. Foi realizada nova centrifugação e essa etapa de lavagem das células (ressuspensão em glicerol seguida de centrifugação) foi repetida mais 2 vezes, com volumes decrescentes de solução de glicerol, ou seja, 10 ml e 2 ml. O *pellet* final foi então ressuspensado em 1 ml de glicerol 10%, e a suspensão foi armazenada a -80°C em duas alíquotas de 50  $\mu$ l.

### **3.1.6. Transformação da ClearColi por Eletroporação**

O estoque de células eletrocompetentes de ClearColi foi descongelado em banho de gelo e incubado com o DNA plasmidial de pET28a+SpaA e pET28a+DnaK, extraídos pelo kit de *Mini-Prep* (Cellco). Os parâmetros para a eletroporação foram de 10  $\mu$ F de capacitância, 1,8 KV e 600 Ohms de resistência (eletroporador Bio-Rad, modelo Gene Pulser). Para efetuar o pulso foram pipetados na cubeta 25  $\mu$ l da suspensão de células ClearColi e 200 ng de DNA. Imediatamente após o pulso, foram adicionados 975  $\mu$ l de meio recuperação de expressão (Lucigen) à cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 ml, a fim de ser incubada por 1 hora a 37°C e 250 rpm. Após isso, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 100  $\mu$ l da cultura em placas de LB ágar com canamicina 30  $\mu$ g/ml, as quais foram então incubadas a 37°C por 18 horas.



### 3.1.7. Checagem dos insertos do pET28a+SpaA e pET28a+DnaK em ClearColi

Uma das colônias de ClearColi transformada de cada clone, contendo pET28a+SpaA ou pET28a+DnaK, foi cultivada *overnight* em 5 ml de meio LB contendo 30 µg/ml do antibiótico canamicina, em *shaker* orbital a 37°C, a 250 rpm *overnight*. O DNA plasmidial foi extraído desses cultivos utilizando o kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit - L Pack* (Cellco) e quantificados em aproximadamente 300 ng/µl cada no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

Um volume de 5 µl do DNA extraído de cada clone (~1,5 µg) foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 20 mM ácido acético glacial), sendo a corrida realizada por 30 minutos em voltagem constante de 100 V. As bandas no gel de agarose foram analisadas sob luz ultravioleta (UV).

Para a verificação da construção pET28a+SpaA inserida nas células de expressão ClearColi foi realizada reação de PCR utilizando 1 unidade por reação (0,5 ul) da enzima *Dream taq* polimerase (Fermentas), em um termociclador (Px2 Thermal Cycler – Thermo) e tendo como molde o DNA plasmidial das bactérias transformadas. Nessa reação foram utilizados 10 µM cada dos primers iniciador direto SpaA\_For-NcoI e o iniciador reverso SpaA\_Rev-HindIII (Tabela 1). Depois da desnaturação do DNA a 95°C, os primers foram hibridizados com a fita molde a 55°C por 1 minuto, e a extensão das novas fitas de DNA foi realizada a 72°C por 3 minutos. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 1.** *Primers* para amplificação da sequência codificadora do gene *spaA* As bases sublinhadas correspondem aos nucleotídeos pertencentes aos sítios de restrição para *NcoI* e *HindIII*.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA
SpaA_For- <i>NcoI</i>	5' CATG <u>CCATGGG</u> GCTACCAAAGTTTCGAAGC 3'
SpaA_Rev- <i>HindIII</i>	5' CCCAAGCTTATCTTTAGGTTTTTCTT 3'

Dada a ausência de primers disponíveis para a verificação da construção pET28a+DnaK nas células de expressão ClearColi, foi realizada a digestão com enzimas de restrição (Thermo Scientific) condizentes com a construção do plasmídeo

em questão. Para liberar o inserto de DnaK do vetor, 1,5 µg do DNA plasmidial extraído por *mini-prep* foi digerido com 1 µl cada das enzimas *NdeI* e *BamHI* (Tabela 2) a 37°C por 10 horas e o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 2.** Enzimas de restrição utilizadas para clonagem e digestão do inserto *dnaK* no vetor de expressão pET28a(+).

ENZIMA DE RESTRIÇÃO	SÍTIO DE RECONHECIMENTO
<i>BamHI</i>	G <sup>^</sup> GATCC
<i>NdeI</i>	CA <sup>^</sup> TATG

^ Ponto de clivagem da enzima.

### 3.1.8. Expressão Heteróloga das Proteínas SpaA e DnaK

Várias condições de expressão foram avaliadas para que as proteínas SpaA e DnaK de *E. rhusiopathiae*, clonadas no vetor pET28a(+), fossem expressas de forma heteróloga em células ClearColi. Foram testadas diferentes temperaturas de expressão (37°C, 30°C e 20°C); concentrações de indutor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) de 0,1 mM e 0,4 mM; e também foram testados meios de cultura como o LB, Terrific Broth (TB) (Tabela 3) e Dinamite.

**Tabela 3.** Composição do meio Terrific Broth (TB), utilizado para os cultivos.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Triptona	20 g/l
Extrato de Levedura	24 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l
Glicerol	4 ml/l
°KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g/l
°K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	16,37 g/l
Água destilada	qsp

° Os fosfatos devem ser autoclavados separadamente dos outros componentes para não precipitarem.

Uma colônia foi incubada overnight em 5 ml de meio contendo 30 µg/ml de canamicina a 37°C e 250 rpm. Depois, 1 ml do inóculo foi transferido para 100 ml de

meio até que a cultura atingisse  $DO_{595nm}$  de 0,7 em LB, 0,2 (diluída 1/10) em TB e 0,5 (diluída 1/10) no meio Dinamite (Tabela 4). Para a expressão das proteínas recombinantes foi feita a adição de IPTG em uma concentração final de 0,1 mM ou 0,4 mM, e o cultivo foi incubado novamente em 250 rpm e 37°C, 30°C ou 20°C por mais 4 horas, 8 horas ou 18 horas, respectivamente.

**Tabela 4.** Composição do meio Dinamite utilizado para os cultivos.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Triptona	12 g/l
Extrato de Levedura	24 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l
Glicose	5 g/l
Glicerol	6,3 ml/l
°KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,6 g/l
°K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	16,37 g/l
Água Destilada	qsp

#### pH 7.14

° Os fosfatos devem ser autoclavados separadamente dos outros componentes para não precipitarem.

Depois de padronizadas e confirmadas as expressões por SDS-PAGE (meio, temperatura e concentração de IPTG), os cultivos de ClearColi pET28a+SpaA e pET28a+DnaK foram centrifugados a 4°C, 10.000 x g por 15 minutos. Os pellets relativos à expressão de cada proteína foram ressuspensos em 20 ml tampão de sonicação Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM NaCl), contendo 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), um inibidor de proteases. 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), no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Ferreira de Souza do Departamento de Química (DQ/UFSCar). Os lisados foram centrifugados sob as mesmas condições anteriores para separar os sobrenadantes (fração solúvel) e pellets (fração insolúvel).

### 3.1.9. Procedimentos para Eletroforese e Quantificação de Proteínas

Em geral, os procedimentos utilizados foram realizados segundo Sambrook e Russell (2001), ou então descritos conforme são citados. Para as separações por SDS-PAGE as proteínas foram submetidas a 150 V por 2 horas em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 190 mM glicina) com 0,1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Os géis foram feitos com 14% de poliacrilamida e corados no final com o corante Coomassie Blue-silver. Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras celulares foram normalizadas para que tivessem  $DO_{595nm}$  de 1, e as frações solúveis e insolúveis aplicadas foram diluídas em 10 vezes. Todas as amostras aplicadas possuíram um volume final de 20  $\mu$ l e foram preparadas com tampão de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,6; 10% glicerol; 2% SDS; 5%  $\beta$ -Mercaptoetanol; traços de azul de bromofenol) e fervidas a 100°C (LAEMMLI, 1970). O marcador de peso molecular utilizado foi o *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco, S. Carlos-SP).

Para a quantificação das proteínas recombinantes após expressão e purificação foi utilizado o método de Bradford, adicionando 1  $\mu$ l de proteína em 159  $\mu$ l de água destilada e 40  $\mu$ l do reagente *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) (BRADFORD, 1976). A absorbância da reação foi medida em equipamento iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) com comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi montada a partir da diluição seriada (5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg/ml) de solução-estoque de albumina de soro bovino (BSA). Foi substituído 1  $\mu$ l de proteína por 1  $\mu$ l de água destilada para a reação branco. Todas as reações foram feitas em triplicata.

### 3.1.10. Solubilização dos Corpos de Inclusão

A proteína presente na fração insolúvel foi solubilizada a partir de corpos de inclusão sob agitação suave por 45 minutos à temperatura ambiente na 1ª. solução de solubilização com 3 M de uréia ou cloridrato de guanidina (Tabela 5), sendo a solução centrifugada a 18000 x g por 30 minutos a 4°C, e o *pellet* lavado duas vezes no mesmo tampão. O *pellet* foi agitado na 2ª. solução de solubilização com uréia ou cloridrato de guanidina 8 M (Tabela 5) por 20 horas a 10°C.

**Tabela 5.** Tampões de solubilização dos corpos de inclusão.

---

**TAMPÃO DE**

---

SOLUBILIZAÇÃO	COMPONENTES
1.º	100 mM Tris-HCl pH 8; 1% TritonX-100; 3 M de °Cloridrato de Guanidina ou °Uréia
2.º	50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM Ditioneitol (DTT); 8 M de °Cloridrato de Guanidina ou °Uréia

° A solução deve ficar sob agitação por 15 minutos depois da adição dos agentes desnaturantes para não precipitarem.

### 3.1.11. Purificação das Proteínas Recombinantes por Cromatografia de Afinidade

As proteínas rSpaA e rDnaK foram purificadas a partir das frações solúveis e insolúveis por cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) (HOCHULI, 1988), usando uma coluna Poli-Coluna Prep® (Bio-Rad) com 1 ml ou 5 ml de resina IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) carregada com sulfato de níquel. Com as colunas previamente equilibradas com tampão de ligação (Tabela 6), as soluções contendo as proteínas solúveis, foram adicionadas e o eluato coletado. Em seguida, as colunas foram lavadas 3 vezes com tampões de ligação (Tabela 6) sendo que, para cada lavagem foi utilizado 5 vezes o volume de coluna (VC) das soluções. Após as lavagens, as proteínas aderidas às resinas foram eluídas e recuperadas pela adição de 1 vez o VC de tampão de eluição (Tabela 6) com diferentes concentrações de imidazol (de 2 mM a 2 M) ou em diferentes valores de pH (de 7 a 4), dependendo de cada proteína (Tabela 6).

**Tabela 6.** Tampões de ligação e eluição específicos para a purificação das proteínas rDnaK e rSpaA, por cromatografia.

Tampão/ Proteína	rDnaK	rSpaA
Tampão de Ligação	50 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O, pH 7,4; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 6 M °Uréia
Tampão de Eluição	50 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O, pH 7,4; 500 mM NaCl; 6 M °Uréia

° A solução deve ficar sob agitação por 15 minutos depois da adição dos agentes desnaturantes para não precipitarem.

As proteínas foram concentradas em 1 ml por ultrafiltração com Amicon® Centrifugal Filter Unit (Merk Millipore), e para retirar o imidazol bem como outras proteínas contaminantes, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular ou *size exclusion chromatography* (SEC) usando uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) com uma taxa de fluxo de 0,5 ml/ minuto. Essa cromatografia foi efetuada no laboratório da Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Dulce Helena Ferreira de Souza (DQ/UFSCar). A proteína recombinante foi eluída em 3,5 ml de solução tampão Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM NaCl) e concentrada a 1 ml. A purificação das proteínas foi avaliada através da visualização em géis SDS-PAGE, sendo colocadas amostras de cada uma das frações eluídas (volume de 20 µl).

### **3.1.12. Western Blot Contra as Proteínas Recombinantes**

O *Western blot* é realizado testando a antigenicidade de epítomos lineares, já que é necessária a utilização do SDS para a melhor separação das proteínas por peso molecular por desnaturação (NELSON, 2014). Assim, depois de quantificadas pelo método de Bradford, 5 µg de cada uma das proteínas recombinantes purificadas (rSpaA e rDnaK) 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-HCl pH 8,3; 190 mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol). Paralelamente ao gel que foi transferido para a membrana foi também obtido um gel com as mesmas amostras, o qual foi corado com Coomassie Blue-silver, para ser utilizado com referência.

#### **3.1.12.1. Western Blot com Soro de Suínos**

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. As membranas foram bloqueadas *overnight* com 9% de leite em pó (Molico, Nestlé) dissolvido em tampão *Tris Buffered Saline*+Tween20 (TBST) (20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 0,01% Tween®20) e incubadas com soros de suínos antes e após imunização (com a vacina comercial para erisipela suína), conforme

descrito acima. 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 1:5000 em tampão TBST e incubados com as membranas por 1 hora cada. Todas as etapas foram mantidas em agitação em *shaker* orbital 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.

#### **3.1.12.2. Western Blot com anti-His-Tag**

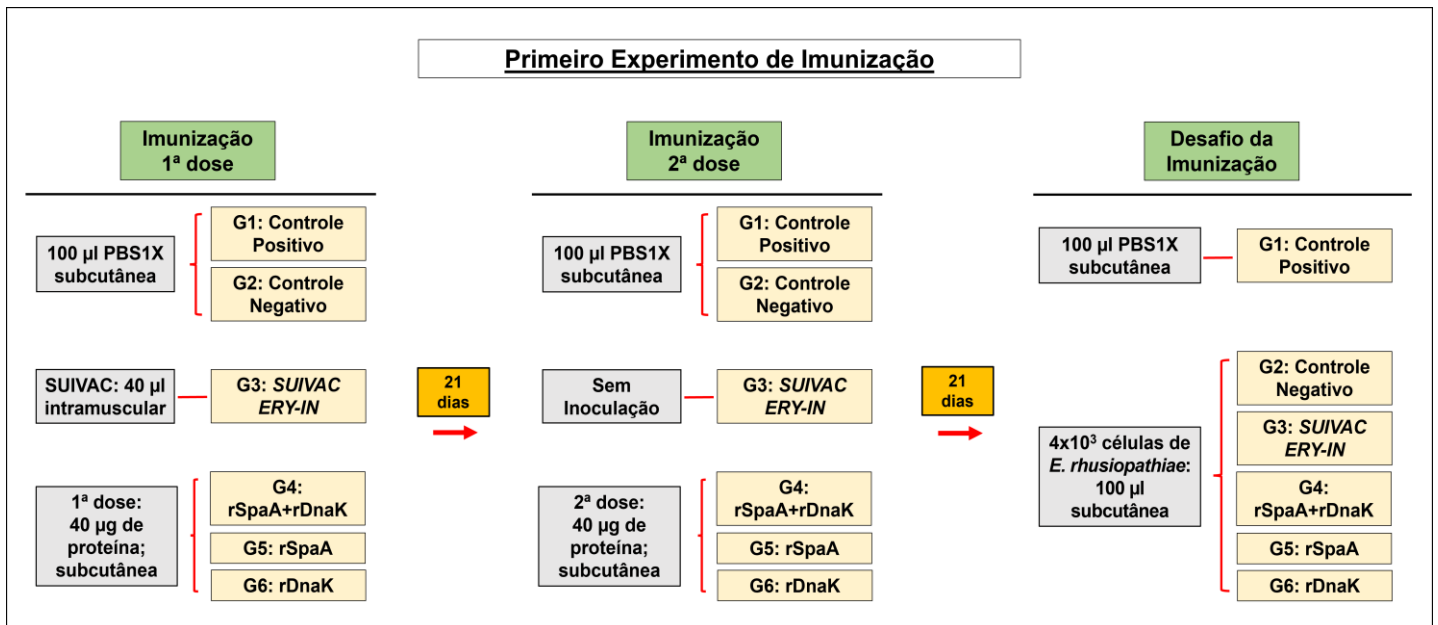
Para a confirmação da expressão das proteínas recombinantes por meio da detecção da cauda de histidina, codificada em fusão pelo vetor de expressão pET28a(+), a membrana de nitrocelulose foi incubada por 2 horas com uma diluição de 1:10000 do anticorpo monoclonal primário anti-*His-Tag* mouse (Invitrogen) seguido por 1 hora e meia da diluição 1:3000 do anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase (GE Healthcare) (método de dois passos). Ligações não específicas foram minimizadas pela pré-incubação da membrana com tampão de bloqueio, constituído por 5% leite em pó desnatado diluído na solução *phosphate buffered saline* 1X (PBS 1X) (137 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; pH 7,4) com 0,02% de Tween®20 overnight. Para a detecção por quimioluminescência, foi utilizado o *kit Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) e o *blot* foi revelado utilizando o sistema ChemiDoc™ (Bio-Rad).

#### **3.1.13. Imunização dos Camundongos com as Proteínas Recombinantes**

O procedimento para o preparo do inóculo das proteínas separadas consistiu na mistura das proteínas recombinantes e do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> (Dinâmica) (v/v). Ou seja, cada camundongo foi inoculado com 40 µg do adjuvante mais as proteínas rSpaA e rDnak purificadas, tanto separadas quanto em conjunto, em um total de 100 µl de PBS 1X.

Como referência, foi aplicada via intramuscular 40 µl da vacina comercial SUIVAC® ERY-IN (SUIVAC), composta de células inativadas de *E. rhusiopathiae*, sendo essa dose 50 vezes menor do que a utilizada comercialmente em suínos (2mL). Essa vacina de referência foi cedida pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva (DEQ/UFSCar).

A imunização dos camundongos teve 2 delineamentos experimentais diferentes. No primeiro experimento, o inóculo com cada proteína recombinante separada foi preparado com 40 µg da rSpaA ou da rDnaK, e com 20 µg de cada uma quando usadas em conjunto, injetadas via subcutanea (Figura 6).



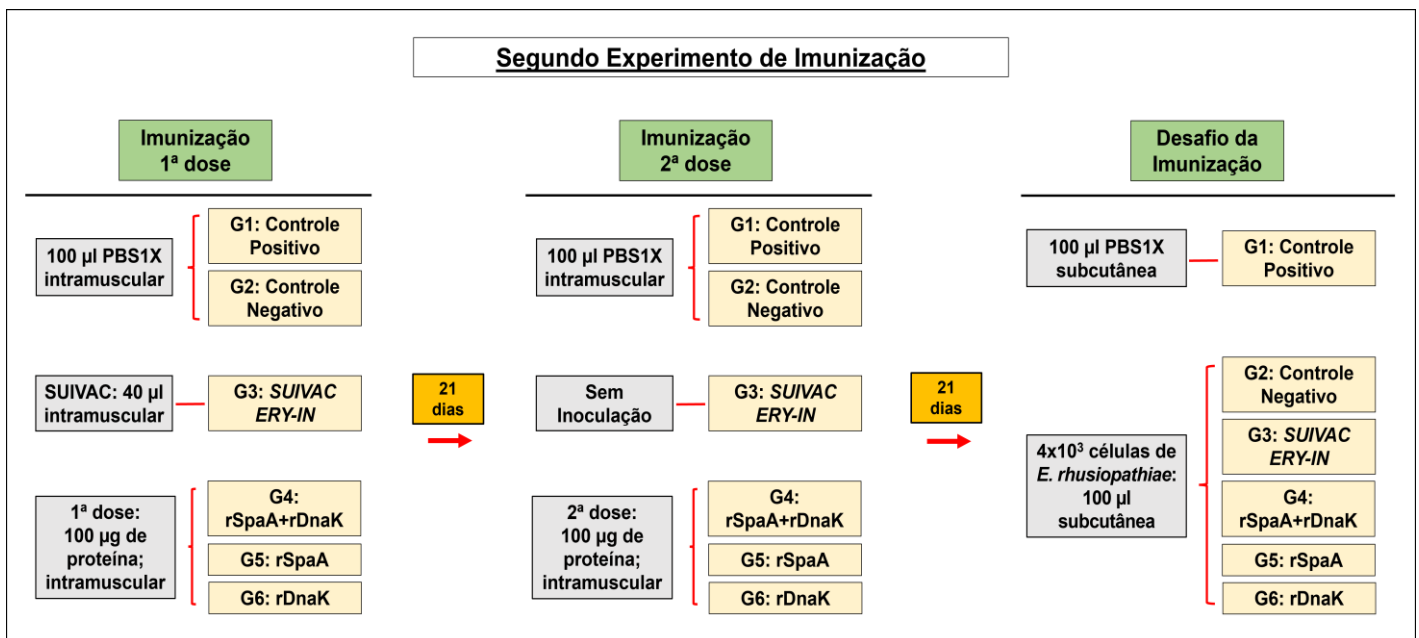
**Figura 6. Delineamento experimental do primeiro ensaio de imunização.** Ilustração sobre como o ensaio de imunização foi organizado. Foram divididos 6 grupos diferentes, em que se estabeleceu quais deles seriam inoculados com as proteínas purificadas; quais seriam desafiados e também a quantidade de dias entre as duas doses das proteínas inoculadas e do desafio.

Já no segundo experimento, o inóculo para a imunização dos camundongos foi preparado com 100 µg de cada proteína recombinante (rSpaA ou rDnaK) ou com 50 µg da rSpaA mais 50 µg da rDnaK (rSpaA+rDnaK), injetadas via intramuscular (Figura 7).

Para cada experimento de imunização com as proteínas recombinantes e posterior desafio com células de *E. rhusiopathiae*, 60 camundongos foram divididos



em 6 grupos (Figura 1): G1 - Grupo Controle positivo, inoculados somente com 100 µl de PBS 1X; G2 - Grupo Controle negativo, inoculados somente com 100 µl de uma solução de células da bactéria *E. rhusiopathiae*; G3 - Grupo Referência, 40 µl da vacina de referência SUIVAC; G4 - Grupo rSpaA+rDnaK, 100 µl das proteínas recombinantes rSpaA+rDnaK; G5 - Grupo SpaA, 100 µl da proteína recombinante SpaA; G6 - Grupo rDnaK, 100 µl da proteína recombinante rDnaK. Após o procedimento de inoculação, os animais foram acompanhados diariamente, e depois de 21 dias os grupos G4; G5 e G6 foram inoculados novamente com uma segunda dose de 100 µl das proteínas recombinantes respectivas de cada grupo.



**Figura 7. Planejamento experimental do segundo ensaio de imunização.** Foram estabelecidos seis grupos diferentes. Os camundongos foram imunizados intramuscularmente com as proteínas recombinantes purificadas e com a vacina comercial. Os grupos de controle positivo e negativo foram apenas injetados com PBS 1X. Vinte e um dias após a primeira injeção, uma segunda dose das proteínas recombinantes foi inoculada. Após mais vinte e um dias, o desafio com a bactéria *E. rhusiopathiae* foi realizado por via subcutânea e o grupo de controle positivo foi novamente injetado apenas com PBS 1X. Três dias após o desafio, o sangue dos camundongos foi coletado para análises posteriores.

### 3.1.14. Desafio *in vivo* com células de *E. rhusiopathiae*

Após o período de 21 dias da segunda imunização com as proteínas recombinantes, os camundongos dos grupos G2 ao G6 foram desafiados com 4000 células da bactéria *E. rhusiopathiae* NCTC 11002, através da via subcutânea. Para a contagem de células de *E. rhusiopathiae* foi realizado um inóculo em 100 ml de meio líquido Feist modificado (Tabela 7), sendo o cultivo realizado por aproximadamente 9 horas a 37°C e 140 rpm.

**Tabela 7.** Componentes para o meio Feist modificado e otimizado.

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
Triptona	7,5 g/l
Extrato de Levedura	7,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l
Glicose	9 g/l
Arginina	0,75 g/l
Tween 80	0,75 ml/l
°KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14 g/l
°NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g/l
Água Destilada	qsp

**pH 8**

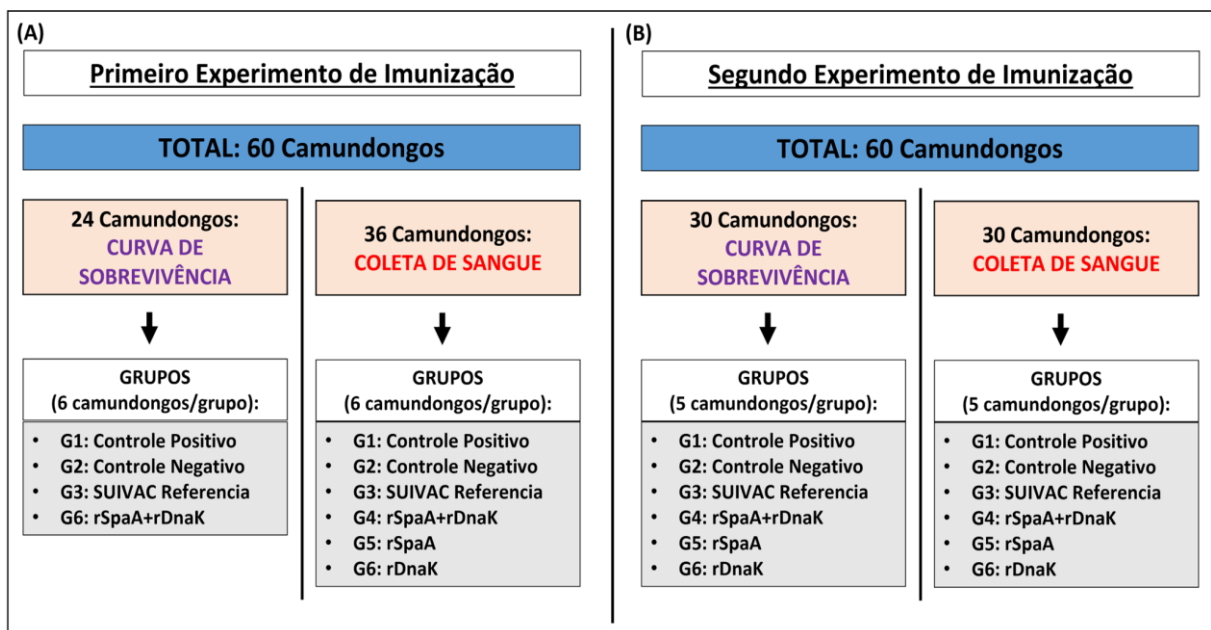
° Os fosfatos devem ser autoclavados separadamente dos outros componentes para não precipitarem.

Quando a DO<sub>595</sub> do cultivo chegou ao valor de 1,2, correspondente a aproximadamente  $4,31 \times 10^6$  unidades formadora de colônias (UFC) por µl de acordo com a tabela 8, um volume de cultura de 1 ml foi utilizado para obtenção das diluições seriadas de 1:1000; 1:10000 e 1:100000 em PBS 1X seguido de plaqueamento em LB (duplicata). As placas foram incubadas a 37°C por 2 dias, e as colônias foram contadas nas diluições de 1:10000 e 1:100000. A concentração de células foi ajustada para que em cada 100 µl da solução houvesse aproximadamente 4000 células de *E. rhusiopathiae* e os camundongos foram inoculados com essa suspensão de bactérias.

**Tabela 8.** Número de UFCs de *E. rhusiopathiae* NCTC 11002 de acordo com a DO<sub>590nm</sub> e com o tempo de crescimento em meio Feist modificado. Dados obtidos nesse trabalho.

DO 590nm	UFC/μL	TEMPO (horas)
0,5	2,30E+03	02:00
0,65	4,53E+05	03:30
0,8	1,23E+06	05:00
1	3,50E+06	08:00
1,2	4,31E+06	09:00

No primeiro experimento de imunização, dos 60 animais totais divididos em 6 grupos, 6 animais de cada um dos grupos G1 ao G4 (=24) foram separados para a realização de uma curva de sobrevivência desses camundongos, após o desafio. Já os outros 36 animais (G1 ao G6) foram divididos igualmente por grupo para que a coleta do sangue fosse realizada, após 3 dias ao desafio (Figura 8A). Já no segundo experimento, 60 camundongos também foram divididos em 6 grupos nos quais cada um foi composto por 10 camundongos, sendo que a metade de cada grupo também foi separada para determinar uma curva de sobrevivência, e a outra metade para a coleta de sangue e órgãos destinada a análises imunológicas (Figura 8B). Foram realizados dois experimentos independentes, delineados abaixo.



**Figura 8. Desenho experimental para avaliação do efeito protetor e de imunogenicidade das proteínas rSpaA e rDnaK de *E. rhusiopathiae* em modelo murino.** Um total de 120 camundongos foram separados pela metade e utilizados entre os ensaios de proteção e ensaios de imunização, e os animais foram divididos pela metade em 2 grandes-grupos. (A) Primeiro ensaio experimental, os grupos G1, G2, G3 e G6 foram iniciados com 12 animais cada, sendo 6 deles separados para realização da curva de sobrevivência após o desafio com a bactéria, enquanto que para os grupos G5 e G6, iniciados com 6 animais cada, foi realizada apenas a análise de anticorpos. (B) Segundo ensaio experimental, de 60 camundongos totais, 30 foram separados para o ensaio de proteção que permite a análise da curva de sobrevivência e 30 camundongos para coleta do soro para o ensaio de titulação de anticorpos. Os grupos de G1 a G6 foram iniciados com 10 animais cada.

### **3.1.15. Eutanásia e Extração do Sangue e Soro de Camundongos**

Após 3 dias do desafio, os animais separados para a coleta de sangue foram previamente anestesiados utilizando o procedimento intraperitoneal de superdosagem de anestésicos, com solução de 270 mg/kg de cetamina (Dopalen, Ceva, Brasil) e 30 mg/kg de xilazina (Anasedan, Ceva, Brasil), para somente depois serem eutanasiados por exsanguinação, por punção braquial. O animal foi fixado à mesa de necropsia, com agulhas inseridas acima das articulações do carpo e tarso, sendo o animal posicionado em decúbito dorsal e distendido. Com tesoura cirúrgica, foi promovida uma incisão da artéria braquial e através dessa, com uma pipeta Pasteur levemente embebida em Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), foi realizada a coleta do sangue de cada camundongo. O soro foi separado por centrifugação a 7000 x g por 15 minutos a 4°C e transferido para tubos de 1,5 ml com tampa, para armazenamento a -20°C.

Após a eutanásia e a extração sangue, os cadáveres dos animais foram acondicionados em saco de lixo branco leitoso e armazenados em freezer -80°C até o recolhimento pelo serviço de coleta de resíduos de serviços de saúde para sua correta disposição final, conforme a legislação vigente.

### **3.1.16. Análise de Anticorpos IgG no Soro dos Camundongos**

As amostras de soro dos animais foram analisadas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para os anticorpos específicos contra antígenos rSpaA e rDnaK de *E. rhusiopathiae*. Os experimentos foram efetuados em triplicata, em que foi realizada a titulação dos anticorpos IgG total; IgG1 e IgG2a. As placas de 96 poços

(Costar) foram sensibilizadas com 50 ng proteína/poço de rDnaK e/ou rSpaA purificadas, e diluídas em tampão carbonato (87 mM NaHCO<sub>3</sub>; 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,5). Após incubação durante a noite a 4°C, cada poço foi lavado 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato PBS 1X+Tween®20, bloqueado com 200 µl de BSA a 1% por 2 horas a 37°C e lavado novamente. Para análise de IgG, 100 µl de soro diluído 1:10 foram adicionados seguidos de incubação a 37°C por 1 a 2 horas. Após nova lavagem, foram adicionados 100 µl da diluição 1:5000 do anticorpo secundário anti-mouse IgG antibody (IgG Total; IgG1 and IgG2a) conjugated to Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Antibody (GenScript). Após incubação por 1 hora a 37°C e lavagem, a detecção foi realizada pela adição de 50 µl de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) e incubação por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As reações foram finalizadas com a adição de 50 µl/poço de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, e foi feita a leitura de absorbância das amostras em comprimento de onda de 490 nm em leitor de microplaca (Bio-rad).

### **3.1.17. Contagem Diferencial do Sangue Periférico de Camundongos**

Primeiramente foi realizada a contagem global de células sanguíneas do sistema imune dos camundongos, em microscópio óptico e na câmara de Neubauer imediatamente após a coleta do sangue, depois a contagem celular diferencial foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos corados com Rapid Panoptic Kit (Laborclin) preparados no momento da punção. A contagem diferencial foi obtida através da relação entre a contagem global de cada grupo e a contagem de 100 células do esfregaço sanguíneo diferenciadas em mononucleadas, neutrófilos e eosinófilos (CHERNECKY & BERGER, 2013).

### **3.1.18. Biodistribuição de *E. rhusiopathiae* nos Tecidos do Baço e Rim**

Os baços e rins direitos de 3 animais de cada grupo foram removidos e macerados separadamente em microtubos contendo 1ml de PBS 1X (Tabela 13) estéril. Alíquotas (100 µl) de diluições 1:10 para os baços ou 1:100 para os rins, foram semeadas em LB agar e incubadas a 37°C. Após 48 horas, as UFCs foram contadas.

### **3.1.19. Curva de Sobrevivência dos Camundongos**

Camundongos de cada um dos 6 grupos (G1 a G6) foram monitorados por 14 dias para analisar a porcentagem de animais que sobreviveram ou morreram após o desafio bacteriano, para construir uma curva de sobrevivência (KAPLAN, 1958). Todos os animais restantes foram sacrificados por uma overdose de anestésicos.

### **3.1.20. Análise Estatística**

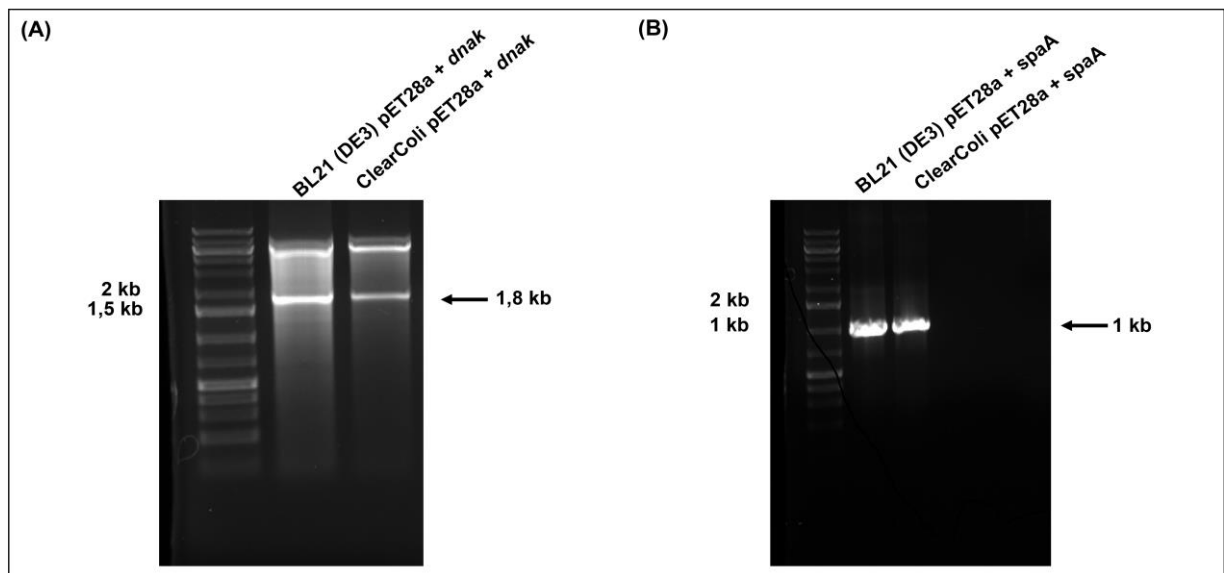
Os dados quantitativos foram analisados por ANOVA one-way para comparação de médias usando o software Prism® (versão 5.0, GraphPad Software). As diferenças individuais entre os grupos foram identificadas por meio do teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e, em todas as análises, adotou-se 5% como limite de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Transformação da ClearColi com os Vetores Recombinantes

As construções em pET18a(+) foram realizadas por da Silva e colaboradores (2012) e por Moraes (2015), em colaboração do grupo de pesquisa de Novo-Mansur (DGE-UFSscar), que clonaram sequências codantes dos genes de *spaA* e *dnaK* de *E. rhusiopathiae* no vetor, respectivamente, e depois transformaram a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3).

Foram feitos dois inóculos separados das linhagens BL21 pET28a+SpaA e BL21 pET28a+DnaK e após o crescimento por 18 horas a 37°C os plasmídeos foram extraídos a partir das células e transformados por eletroporação na bactéria de expressão ClearColi. Após aproximadamente 48 horas de crescimento, colônias transformantes foram observadas na placa. As colônias foram testadas para a construção pET28a+SpaA por PCR, indicado pela amplificação de um fragmento de 1,026 kb utilizando os *primers* SpaA\_For-NcoI e SpaA\_Rev-HindIII. Já a confirmação do clone pET28a+DnaK foi realizada por digestão do plasmídeo pelas enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, indicada pelo fragmento digerido de 1,8 kb (Figura 9).



**Figura 9. Confirmação da transformação da ClearColi por eletroporação com os plasmídeos recombinantes.** (A) Fragmento *dnaK* clonado no plasmídeo pET28a(+), obtido a partir de uma *mini-prep* de bactérias *E. coli* BL21(DE3) e ClearColi, por meio de digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI*. (B) Fragmento *spaA* clonado no plasmídeo pET28a(+), obtido a partir de *mini-prep* de *E. coli* BL21(DE3) e de ClearColi, amplificado com os iniciadores SpaA\_For-NcoI e SpaA\_Rev-HindIII.

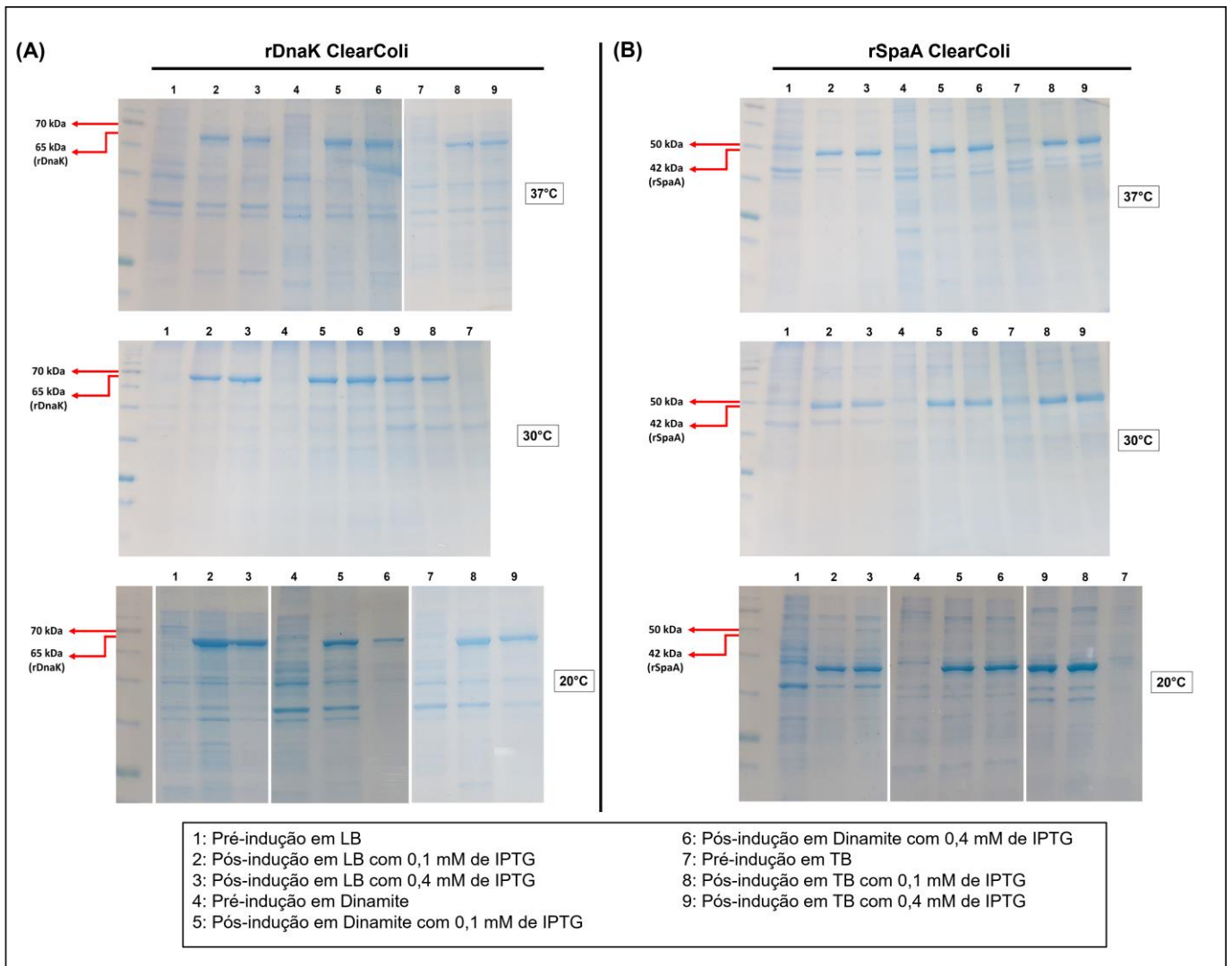
## 4.2. Padronização das Condições de Expressão

A proteína SpaA nativa de *E. rhusiopathiae* possui um tamanho de aproximadamente 60 kDa (MAKINO, S. *et al.*, 1998). Porém, para a construção do clone pET28a+SpaA utilizado nesse trabalho, o inserto da sequência codante parcial clonada é traduzido em uma proteína de 42 kDa (região imunogênica de 342 aminoácidos da região N-terminal), sendo 1 kDa proveniente da cauda de 6 histidinas (*His-Tag*) adicionada pelo vetor pET28a(+) (IMADA *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2012). Já o fragmento do gene *dnaK* de *E. rhusiopathiae* utilizado nesse trabalho, codifica uma proteína de 65 kDa, sendo 1 kDa também proveniente da cauda *His-Tag* do vetor de expressão (MORAES, 2015).

Com as inserções dos genes validadas em ClearColi, foram testadas várias condições de expressão para avaliar qual método fornecia maior quantidade de proteína na forma solúvel. Para isso, as bactérias de expressão contendo separadamente as construções pET28a+SpaA e pET28a+DnaK, foram induzidas em meios LB; TB e Dinamite, sendo que em cada meio de cultivo a expressão das proteínas foi testada em 37°C, 30°C e 20°C, e induzida com 0,1mM e 0,4mM de IPTG (Figura 10).

A proteína rDnaK foi efetivamente expressa em todos os meios de cultivo citados anteriormente e em todas as temperaturas testadas; e também foi expressa tanto na concentração com 0,1 mM quanto com 0,4 mM de IPTG. Assim, foi estabelecido que a melhor condição de expressão da rDnaK em ClearColi seria em meio LB a 20°C, induzido com 0,1 mM de IPTG (Figura 10A). Depois de cultivadas e induzidas, as células de ClearColi expressando a proteína foram sonicadas, liberando a rDnaK que se apresentou principalmente na fração solúvel do lisado de células, ou seja, no sobrenadante (Figura 11).

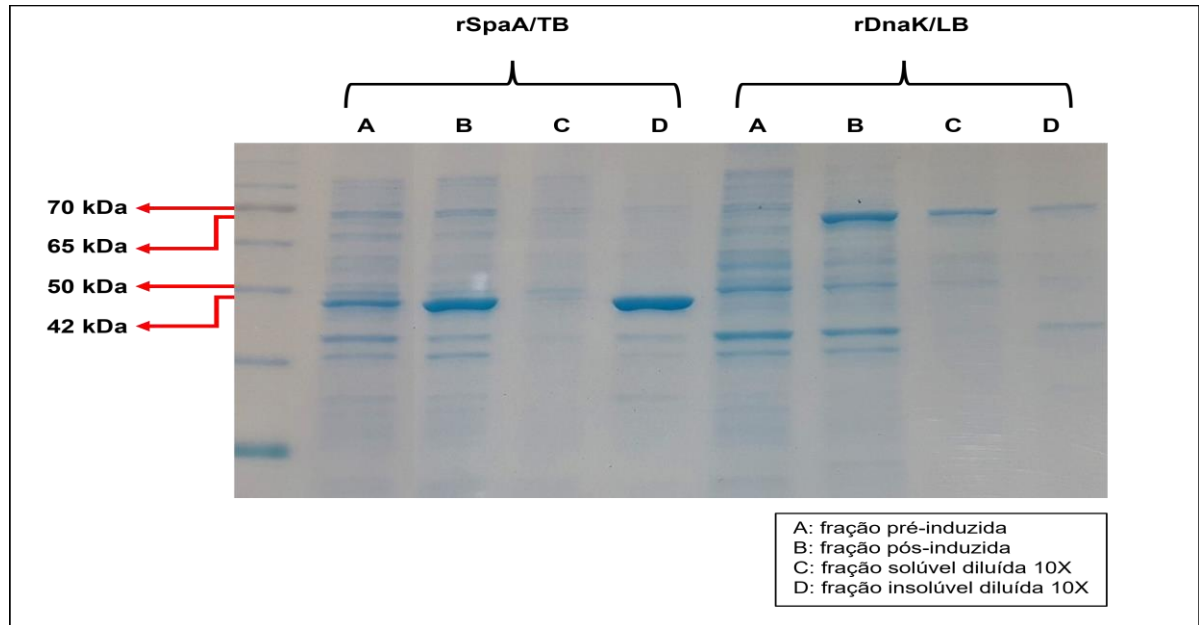




**Figura 10. Análise por SDS-PAGE da expressão das proteínas rDnaK e rSpaA em ClearColi em meio LB, Dinamite e TB, variando as condições de expressão.** (A) Variação das condições de expressão da rDnaK (65kDa). A proteína recombinante foi induzida nas temperaturas de 37°C, 30°C e 20°C com 0,1 mM ou 0,4 mM de IPTG, em todos os 3 diferentes meios de cultivo. (B) rSpaA (42 kDa) expressa em temperaturas de 37°C, 30°C e 20°C com 0,1 mM ou 0,4 mM de IPTG. Todas as variações nas condições de expressão foram analisadas nos meios LB, Dinamite e TB.

A proteína rSpaA foi expressa de forma efetiva principalmente em meio TB e Dinamite; nas temperaturas de 37°C, 30°C e 20°C, e foi induzida tanto com 0,1 mM quanto com 0,4 mM de IPTG (Figura 10B). Porém, se apresentou de forma insolúvel (precipitado do sonicado) em todas os meios de cultivo e temperaturas de indução testados, o que dificultou seguir para a sua purificação. Assim, já que uma temperatura mais baixa poderia melhorar a solubilização da proteína, pois os processos celulares ficariam mais lentos e, portanto, reduziriam as taxas de transcrição, tradução, divisão

celular e agregação de proteínas (SAMUELSON, 2011), foi estabelecido que a melhor condição para expressar a proteína rSpaA em ClearColi seria a 20°C em meio TB, induzido com 0,1 mM de IPTG (Figura 11).

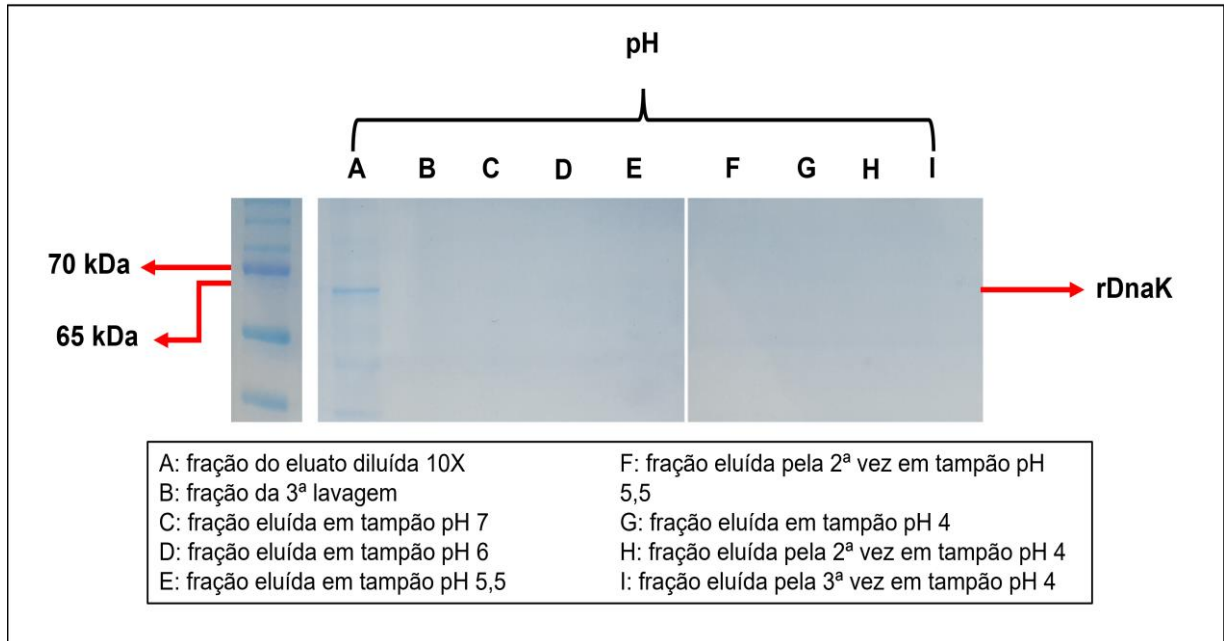


**Figura 11. Expressão das proteínas recombinantes rSpaA e rDnaK em ClearColi.** A proteína rSpaA possui um tamanho de ~42 kDa e foi induzida em meio de cultura TB, enquanto a rDnaK possui um tamanho de ~65 kDa e foi induzida em meio de cultura LB. Para a expressão das duas proteínas, uma temperatura de 20°C e 0,1 mM de IPTG foram utilizados. (A) Fração antes da adição de IPTG. (B) Fração após a adição de IPTG ao meio de cultura, mostrando a indução da expressão das proteínas recombinantes. Após a indução, as células cultivadas foram lisadas por ultrassom e separadas em frações solúveis e insolúveis, com rDnaK sendo encontrado na fração solúvel (C) e em menor grau na fração insolúvel (D) e rSpaA apenas na fração insolúvel (D).

### 4.3. Purificação das Proteínas Recombinantes após Expressão Heteróloga

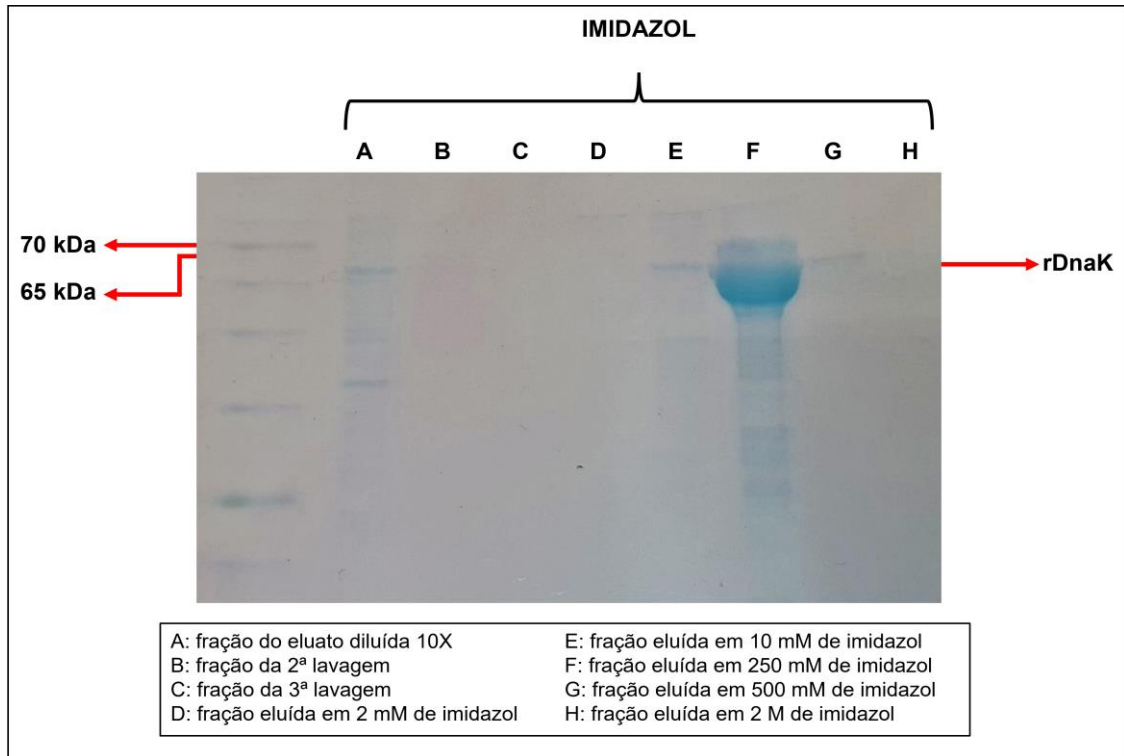
#### 4.3.1. Purificação da Proteína rDnaK Expressa em ClearColi

Após a padronização das condições de expressão em ClearColi, iniciaram-se os ensaios de purificação da proteína rDnaK por cromatografia de afinidade com 1 ml de resina de níquel. Foi realizada a eluição da proteína com o tampão de eluição (Tabela 6), ajustando-se o pH para valores de 7; 6; 5,5 e 4 onde podemos observar na figura 12, que não foi possível eluir a proteína rDnaK da coluna de afinidade por diminuição do pH do tampão.



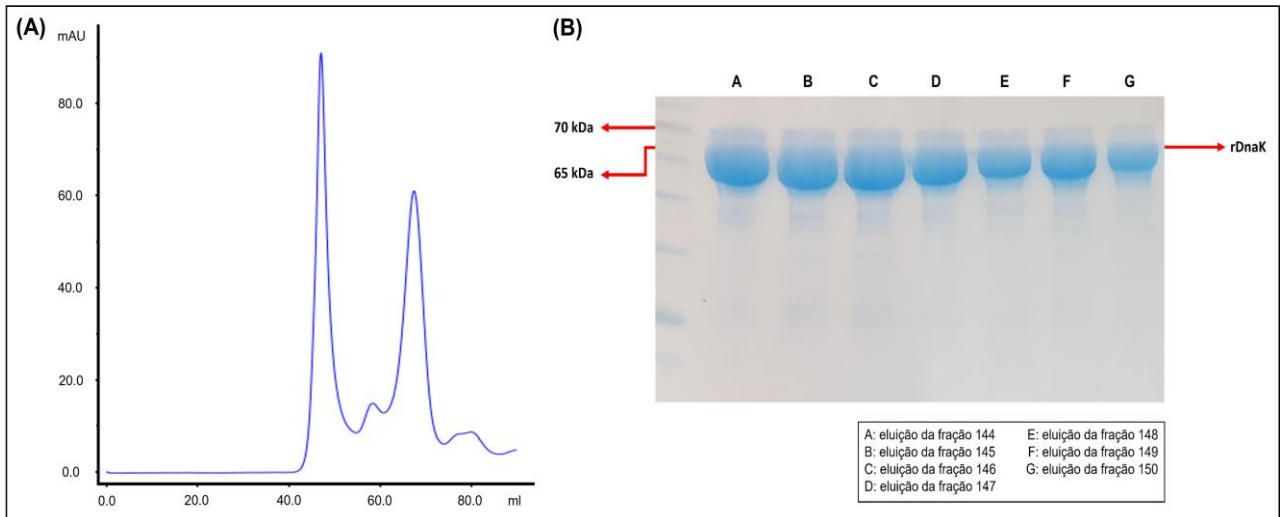
**Figura 12. Análise de SDS-PAGE da purificação da proteína rDnaK por IMAC e eluição pela diminuição de pH.** A proteína rDnaK (65 kDa) foi induzida a 20°C e com 0,1 mM de IPTG, em 100 ml de meio LB, pelo sistema expressão em Clear Coli. A purificação foi realizada em uma coluna de 1 ml contendo níquel e a diminuição de pH (7; 6; 5,5 e 4) do tampão foi utilizada para a eluição da proteína.

Logo, foi realizada uma outra tentativa de purificação dessa proteína por gradiente de imidazol (2 mM; 10 mM; 250 mM; 500 mM e 2 M), de modo a aumentar o rendimento da proteína pela eluição em uma única fração. Na figura 13 podemos observar que foi possível obter a proteína rDnaK, de 65 kDa (1 kDa da cauda *His-Tag*), em uma fração de 250 mM de imidazol em tampão de eluição, sendo que em concentrações menores de imidazol foram eliminadas proteínas contaminantes que tinham fraca afinidade a coluna de níquel.



**Figura 13. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína rDnaK por IMAC com eluição em gradiente de imidazol.** A proteína rDnaK foi induzida a 20°C e com 0,1 mM de IPTG, em 250 ml de meio LB, pelo sistema de expressão em ClearColi. A purificação foi realizada com 1 ml de resina de níquel e eluída com um gradiente de imidazol (2 mM, 10 mM, 250 mM, 500 mM e 2 M).

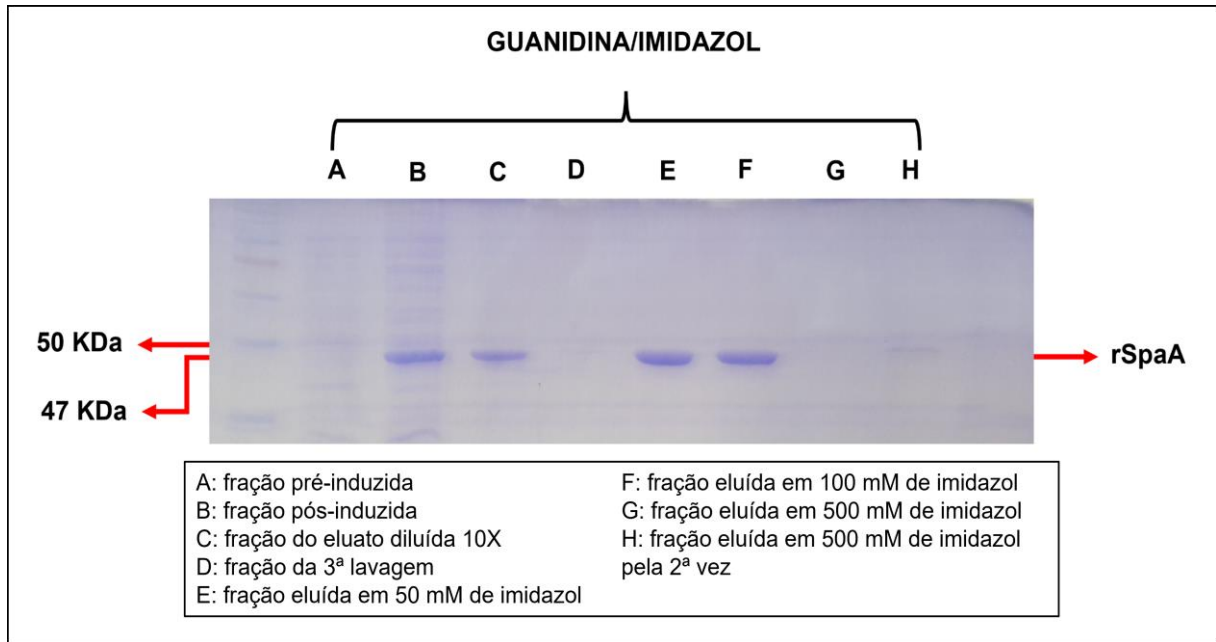
A rDnaK foi concentrada em 1 ml por ultrafiltração, porém mesmo após a sua purificação, a proteína ainda apresentava muitos contaminantes. Então foi realizada uma cromatografia SEC em que a rDnaK foi eluída em 60-80 nm entre os volumes 43 ml e 75 ml na solução de Tris-NaCl, sendo que os volumes de 72 ml a 75 ml (correspondentes as frações 144 a 150) foram selecionados por não apresentarem contaminantes e concentrados em 1 ml total (Figura 14).



**Figura 14. Análise por SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular da proteína rDnaK.** (A) Cromatograma da purificação da rDnaK em que a proteína foi eluída no terceiro pico a uma absorvância de 60 nm. (B) Após a purificação em uma coluna de níquel, a proteína rDnaK foi submetida à SEC e, em seguida, eluída principalmente nas frações 144 a 150, que correspondem a um pico formado no cromatograma. As frações correspondem ao tamanho esperado da proteína rDnaK (65 kDa). Observação: as concentrações de proteína não foram quantificadas ou equalizadas para a análise deste gel.

#### 4.3.2. Purificação da Proteína rSpaA Expressa em ClearColi

Como a proteína rSpaA expressa em ClearColi foi encontrada na forma insolúvel, foi necessário usar agentes desnaturantes a fim de solubilizar essa proteína para somente depois purificá-la. Para retirar a rSpaA dos corpos de inclusão, foi utilizado primeiramente um tampão de solubilização com 8 M de cloridrato de guanidina e podemos observar na figura 15 que a rSpaA foi solubilizada e purificada em 1 ml de resina de níquel, em um tamanho de aproximadamente 42 kDa (1 kDa da cauda *His-Tag*), sendo utilizado um gradiente de imidazol (50 mM; 100 mM e 500 mM) em tampão de eluição (Tabela 10) para purificar essa proteína. A rSpaA foi eluída em tampão com 50mM e 100 mM de imidazol, porém uma quantidade razoável da proteína foi perdida (Figura 15, linha C), o que ocasionou baixo rendimento da proteína purificada.



**Figura 15. Análise de SDS-PAGE do teste de purificação por IMAC da proteína rSpaA solubilizada em cloridrato de guanidina 8 M.** A proteína rSpaA foi expressa pelo sistema de expressão ClearColi a 20°C e com 0,1 mM de IPTG em 100 ml de meio TB. A proteína rSpaA foi solubilizada a partir dos corpos de inclusão utilizando cloridrato de guanidina 8 M como agente desnaturante, e a purificação foi realizada em 1ml de resina de níquel por meio de eluição com gradiente de imidazol.

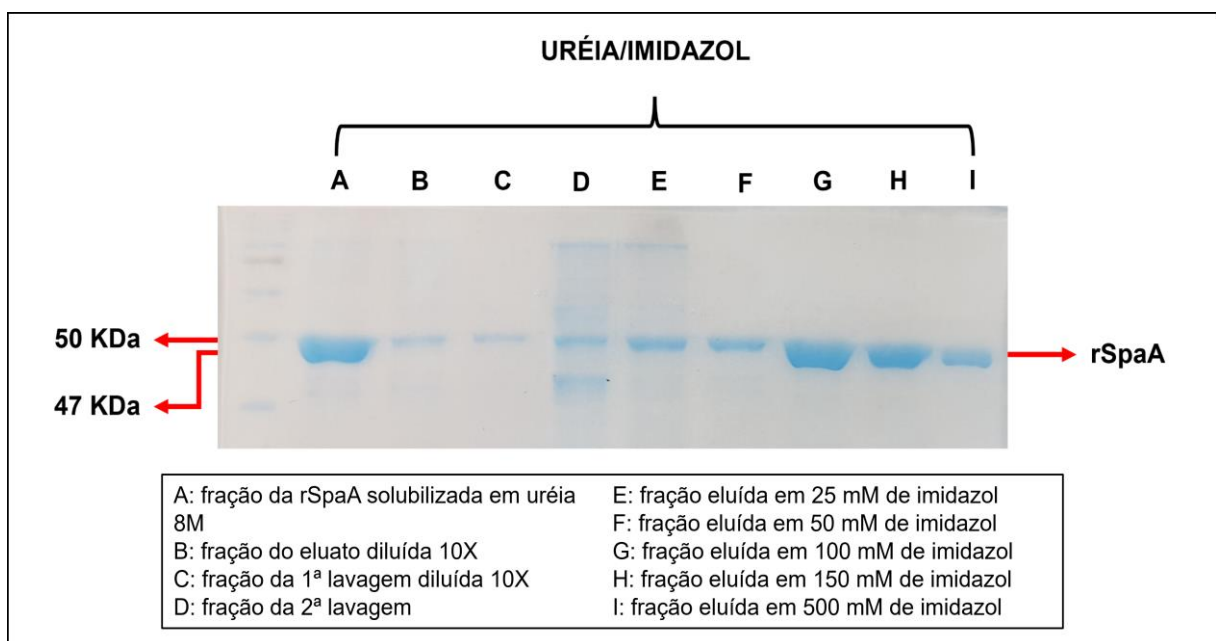
Ainda, foram realizados anteriormente testes de toxicidade dos dois agentes de solubilização, cloridrato de guanidina e uréia, sendo que o cloridrato de guanidina, mesmo em concentração 2 vezes menor que a utilizada para solubilizar a proteína, ou seja, 4 M, apresentou grande toxicidade aos camundongos, induzindo os mesmos a óbito (Anibal, comunicação pessoal). Já a uréia, mesmo com a concentração de 6 M, não induziu nenhum sintoma detectável de toxicidade nos animais.

Foi então realizada uma nova solubilização da rSpaA em tampão de solubilização com 8 M de uréia, resultando em maior dificuldade de solubilização quando comparada com a solução de cloridrato de guanidina 8 M; apresentando precipitados mesmo depois do tempo total de agitação, e diminuindo o rendimento final da proteína solubilizada. Porém, esse problema foi resolvido obtendo-se um maior volume de cultivo no qual a proteína foi expressa, o que compensou a diminuição do rendimento da rSpaA solubilizada com uréia.

Com a proteína solubilizada de forma efetiva, foi possível realizar a purificação através da coluna de níquel, e para dificultar a perda da proteína junto com o eluato,

alteramos o volume da resina de níquel para 5 ml, aumentando o contato e a afinidade da rSpaA solubilizada com o metal imobilizado.

Na figura 16, podemos observar o perfil de eluição da proteína pelo gradiente de imidazol (25 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM e 500 mM). A rSpaA foi eluída em maiores quantidades e com menos impurezas em 100 mM e 150 mM de imidazol (em tampão de eluição, Tabela 6) e o maior volume da resina de níquel permitiu menor perda no eluato (Figura 16, linhas B e C), resultando em um maior rendimento da purificação.

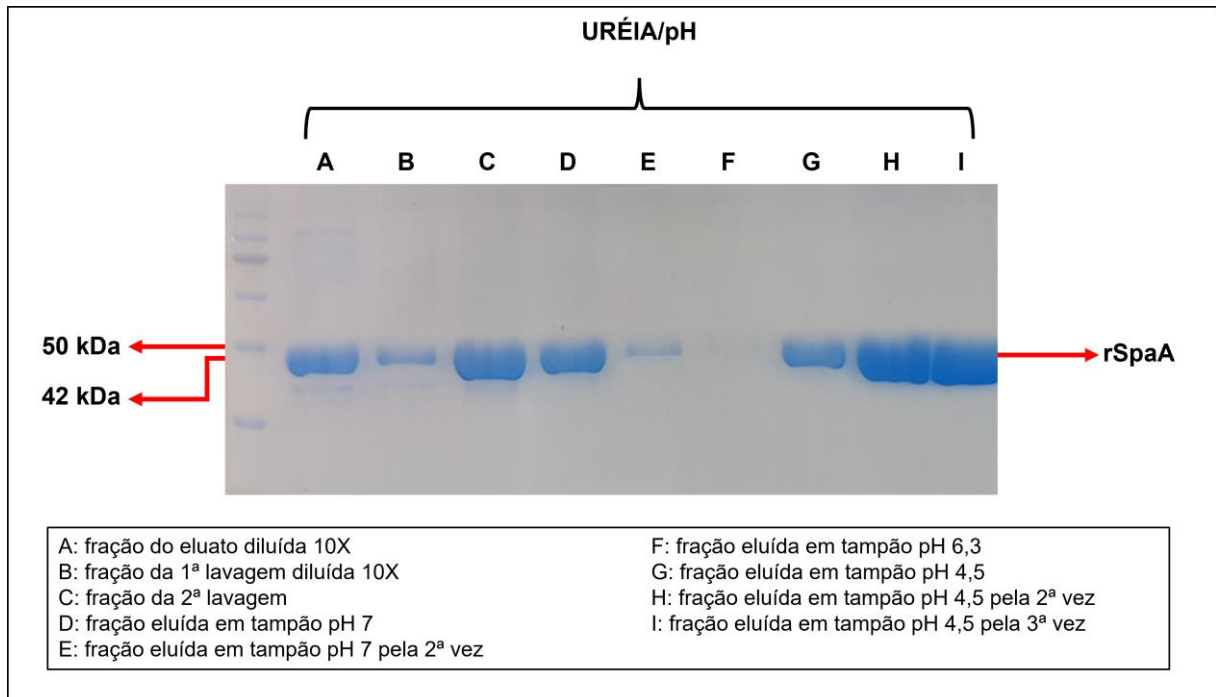


**Figura 16. Análise de SDS-PAGE da purificação por IMAC da proteína rSpaA solubilizada em uréia 6 M.** A proteína rSpaA foi expressa através do sistema de expressão ClearColi a 20°C e com 0,1 mM de IPTG em 250 ml de meio TB. A rSpaA foi solubilizada a partir dos corpos de inclusão em uréia 8 M; a purificação foi realizada em 5 ml de resina de níquel, e a proteína foi eluída por um gradiente de imidazol (25 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM e 500 mM).

Não seria possível utilizar a SEC para remover o imidazol, já que esse método também removeria a uréia do tampão e faria com que a rSpaA voltasse à forma insolúvel. Por isso, também testamos o método de purificação com eluição pela diminuição de pH do tampão, ajustando seus valores para 7; 6,3 e 4,5 (Figura 17), assim a etapa de lavagem para retirada do imidazol não seria necessária. Esse experimento também foi realizado com 5 ml de resina de níquel, e foi possível observar



que mesmo que uma certa quantidade de proteína tenha passado pela coluna junto com o eluato (Figura 17, linha A), a rSpaA apresentou um alto grau de pureza e um maior rendimento em diversas frações do tampão de eluição (Tabela 6) com pH 4,5, quando comparado ao método de purificação anterior, ou seja, por eluição com imidazol (Figura 16).



**Figura 17. Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína rSpaA por IMAC com eluição por diminuição do pH.** A proteína rSpaA foi expressa através do sistema de expressão ClearColi a 20°C e com 0,1 mM de IPTG em 250 ml de meio TB, e após a lise celular, foi solubilizada com 8 M de ureia a partir dos corpos de inclusão. A rSpaA foi purificada em uma coluna com 5 ml de níquel e eluída por diferença de pH (7; 6,3 e 4,5) do tampão de eluição.

#### 4.4. Western Blot das Proteínas rSpaA e rDnaK

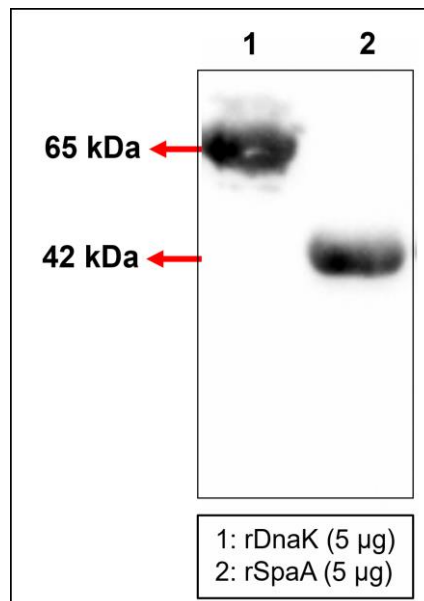
##### 4.4.1. Anti-His-Tag

Para validar que as proteínas expressas e purificadas eram provenientes dos fragmentos inseridos nos vetores de expressão pET28a+SpaA e pET28a+DnaK transformados na bactéria ClearColi, foi realizado um ensaio de *Western Blot* buscando a reação do anticorpo anti-*HisTag* contra a cauda de 6 histidinas, presente



na construção do vetor e expressa na região C-terminal da proteína rSpaA e N-terminal da rDnaK, sendo passível de purificação em coluna de afinidade a metal.

Na figura 18, podemos observar que tanto a proteína rSpaA quanto a rDnaK obtidas pelas purificações anteriores são as proteínas condizentes com a tradução dos genes *spaA* e *dnaK* de *E. rhusiopathiae*, inseridos no vetor de expressão pET28a(+).

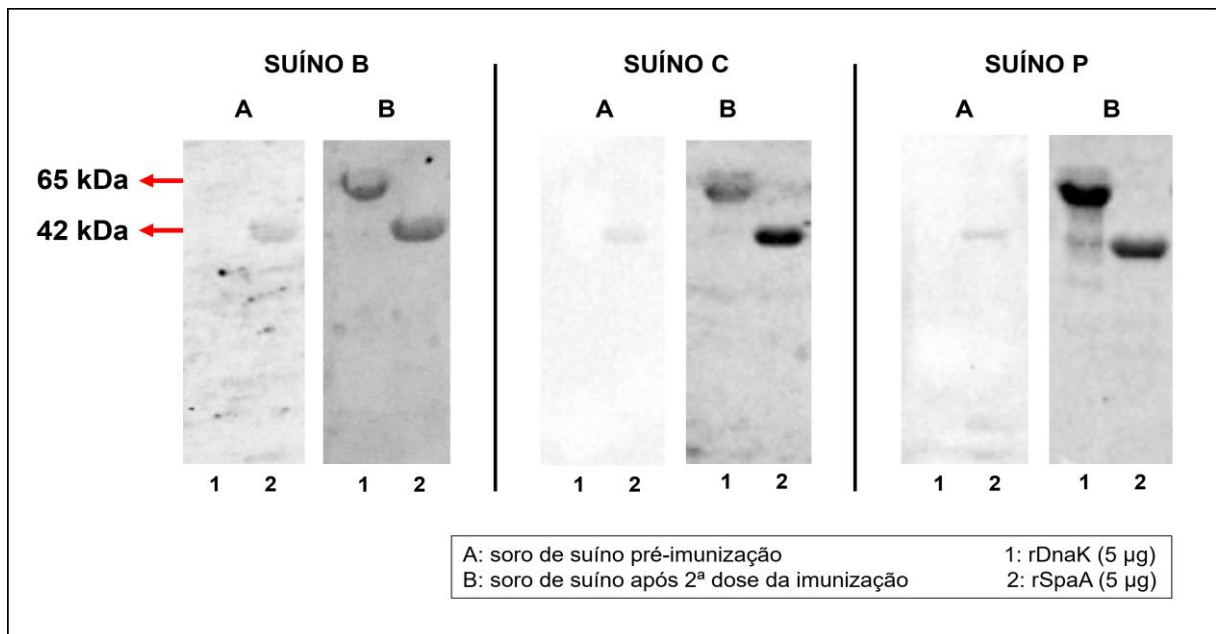


**Figura 18. Western Blot das proteínas recombinantes de SpaA e DnaK de *E. rhusiopathiae* com o anticorpo monoclonal de rato anti-*HisTag*.** As bandas mostram a reação da etiqueta de histidina, presente em 5 µg purificados e equalizados das proteínas rDnaK (1) ou rSpaA (2), contra os anticorpos anti-*HisTag*. As duas bandas correspondem aos tamanhos esperados para as duas proteínas recombinantes.

#### 4.4.2. Soro de Suínos

Após a separação das proteínas rSpaA e rDnaK por SDS-PAGE; transferência para membrana de nitrocelulose e depois revelação, foi possível comparar a reatividade com os soros de suínos antes da imunização e após a segunda dose de imunização da vacina comercial, em 3 animais. Os soros dos suínos foram utilizados como anticorpos primários de captura para avaliar sua reatividade contra as rSpaA e rDnaK purificadas, mostrando se há ou não uma relação dessas proteínas à quantidade de anticorpos imunorreativos presentes nesses animais (Figura 19).

Antes da imunização a proteína rSpaA mostrou baixa reatividade, enquanto a rDnaK não apresentou reatividade detectável com os soros de suínos. Porém, as duas proteínas de interesse apresentaram imunorreatividade com todos os soros coletados após a segunda dose da vacinação, o que é um indicativo do caráter antigênico dessas proteínas em suínos. Ainda, podemos observar que os soros pós-imunização de cada suíno reagiram diferentemente, quando comparados em relação a imunorreatividade às proteínas. O soro do suíno B e P apresentaram a mesma intensidade de reação tanto contra a rDnaK quanto a rSpaA, sendo que o último suíno (P) se mostrou mais reativo. Já no suíno C podemos afirmar que a proteína rSpaA é mais reativa ao soro pós-imunização, do que a rDnaK (Figura 19).



**Figura 19. Western blot das proteínas recombinantes purificadas rSpaA e rDnaK contra soros de suínos pré e pós-imunizados com a vacina comercial contra *E. rhusiopathiae*.** As colunas A representam os soros dos suínos antes de serem imunizados com a vacina comercial; e as colunas B representam os soros de suínos após a segunda dose da vacina. As proteínas rDnaK e rSpaA purificadas e equalizadas (5 µg) foram representadas pelos números 1 e 2, respectivamente.

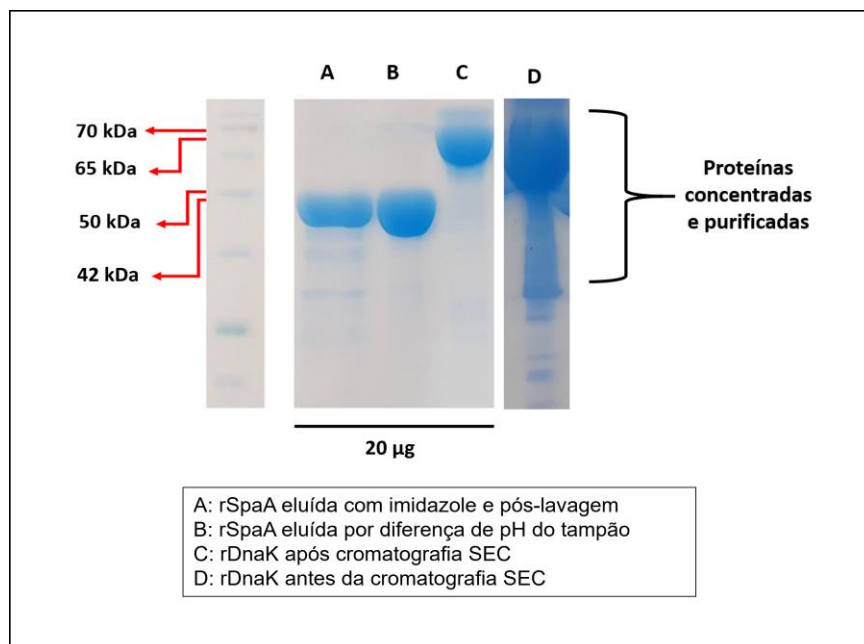
#### 4.5. Preparação das Proteínas Recombinantes como Potenciais Vacinas de Subunidade

A proteína rSpaA resultante da purificação com a eluição por 100 mM e 150 mM de imidazol, foi concentrada e lavada por ultrafiltração diversas vezes em tampão somente com uréia, para reduzir a concentração de imidazol a um valor mínimo,

chegando ao valor final de 1 mg/ml em 1 ml da proteína recombinante. Como podemos observar na figura 20, esse método apresentou mais impurezas e menos rendimento (Figura 20, linha A) quando comparada com a proteína concentrada e purificada em pH 4,5 do tampão de eluição (Tabela 6) com uréia, sendo que quando as diversas frações das eluições de pH 4,5 foram concentradas com o mesmo volume, se obteve uma concentração da rSpaA de 6 mg/mL em 1 ml (Figura 20, linha B). Ou seja, podemos afirmar que a segunda opção foi a mais adequada para ser utilizada no ensaio com camundongos.

Ainda na figura 20 podemos observar que a proteína rDnaK se apresentou livre de contaminantes somente depois de passar pela SEC (Figura 20, linha C e D). As frações de 144 a 150 foram concentradas e chegaram a uma concentração de 3,6 mg/ml em 1 ml total, resultando em um rendimento suficiente para a continuação dos experimentos de indução da imunidade dos animais.

As rSpaA e rDnaK utilizadas para os ensaios de imunização, apresentaram um rendimento final de 24 mg/ml e de 14,4 mg/ml respectivamente, por litro de meio cultivado, dos quais foram utilizados aproximadamente 500 µg cada das proteínas rSpaA e rDnaK para imunizar todos os grupos de camundongos definidos no primeiro experimento, e aproximadamente 1500 µg das proteínas no segundo.



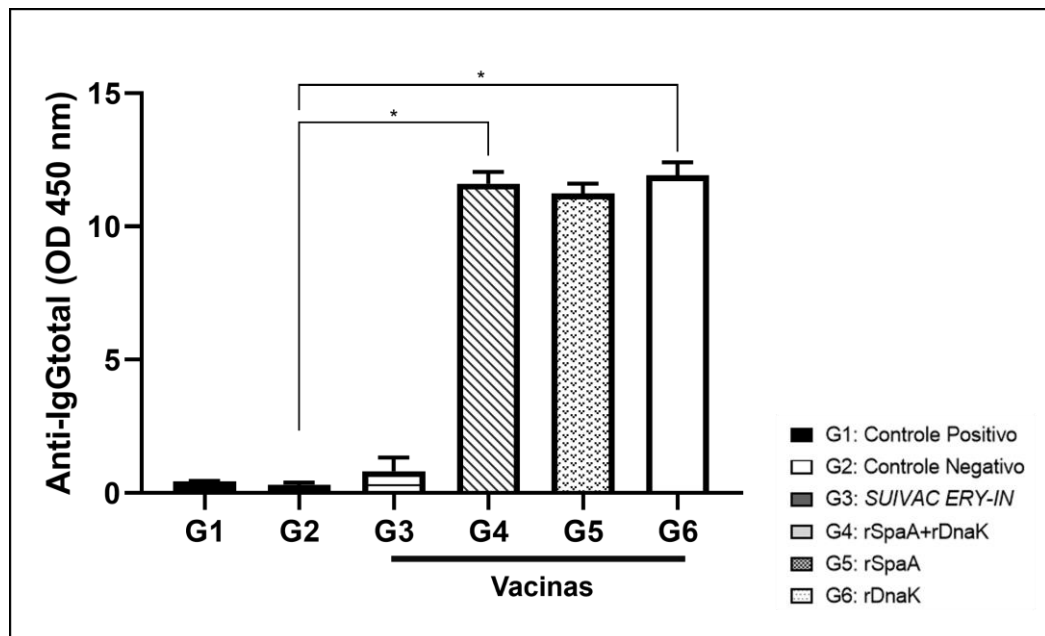
**Figura 20. SDS-PAGE de 20 µg das proteínas rSpaA e rDnaK expressas pelas células ClearColi, após serem purificadas e concentradas. A rSpaA(A) apresentou uma concentração de 1 mg/ml; a**

SpaA(B) de 6 mg/ml e a rDnaK(C) de 3,6 mg/ml. As proteínas utilizadas para a imunizados dos camundongos foram as rSpaA(B) e rDnaK(C). Obs: a proteína concentrada rDnaK(D) antes de passar pelo SEC rDnaK, não foi devidamente quantificada, sendo inoculados no gel 20 ul da amostra total.

#### 4.6. Primeira Análise de Anticorpos IgG total no Soro dos Camundongos

Após 3 dias ao desafio com a bactéria, alguns animais começaram a apresentar sintomas da doença e, antes que esses animais viessem a óbito, o soro de camundongos de todos os grupos foi coletado. O título de anticorpos IgG total no soro de camundongos inoculados com as proteínas purificadas foi cerca de 10 vezes maior que a titulação dos camundongos somente desafiados.

Houve uma diferença estatística do grupo controle G2 para os grupos testes G4 e G6, que mostrou um aumento significativo de anticorpos nos grupos de camundongos imunizados com as rSpaA+rDnaK e com a rDnaK, do que no grupo de camundongos somente desafiados (Figura 21).

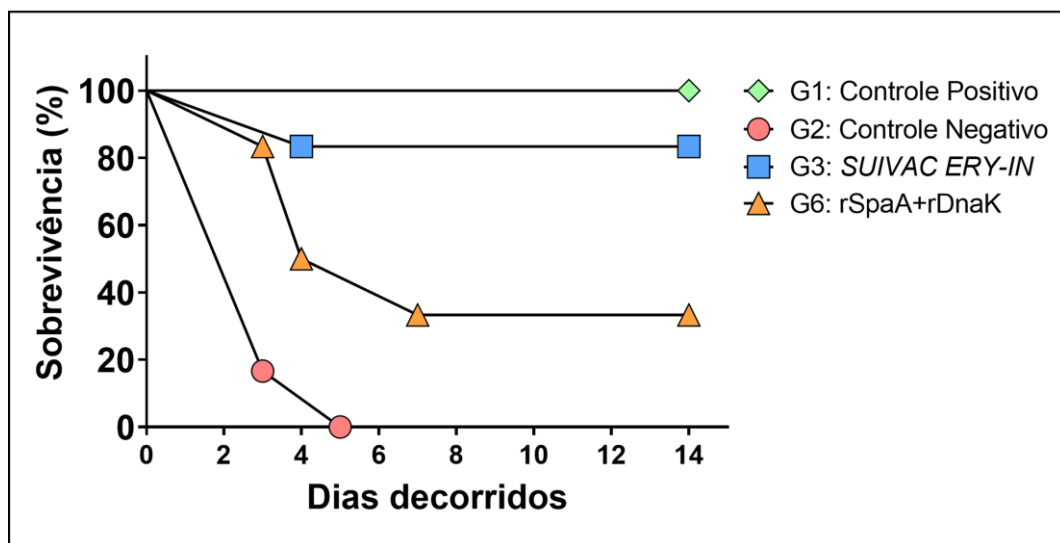


**Figura 21. Primeiro ensaio de imunização e indução de anticorpos.** Títulos de IgG total no sangue de animais isogênicos, 3 dias após a infecção. Os dados foram normalizados, e representam a média EPM (n = 4 animais). \*p < 0,05 representam a diferença significativa dos grupos usando o teste não paramétrico One-way ANOVA.

#### 4.7. Primeira Análise da Curva de Sobrevivência dos Camundongos

Para o ensaio de proteção contra a erisipela, os animais imunizados foram monitorados por 14 dias, observando o tempo de desenvolvimento dos sintomas (febre; fraqueza e apatia) de cada grupo. Podemos observar que o grupo referência G3, como seria esperado para uma vacina celular, mostrou um ótimo efeito protetor com o óbito de apenas 16,6% dos camundongos. Quando comparamos o grupo G2 em que todos os camundongos foram a óbito em 5 dias, com o grupo teste G4, imunizado com as duas proteínas recombinantes, podemos notar a indução de um efeito protetor ao retardar os sintomas da doença em 50% dos camundongos, e ao promover total proteção a 33,3% dos animais que não apresentaram quaisquer sintomas (Figura 22).

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

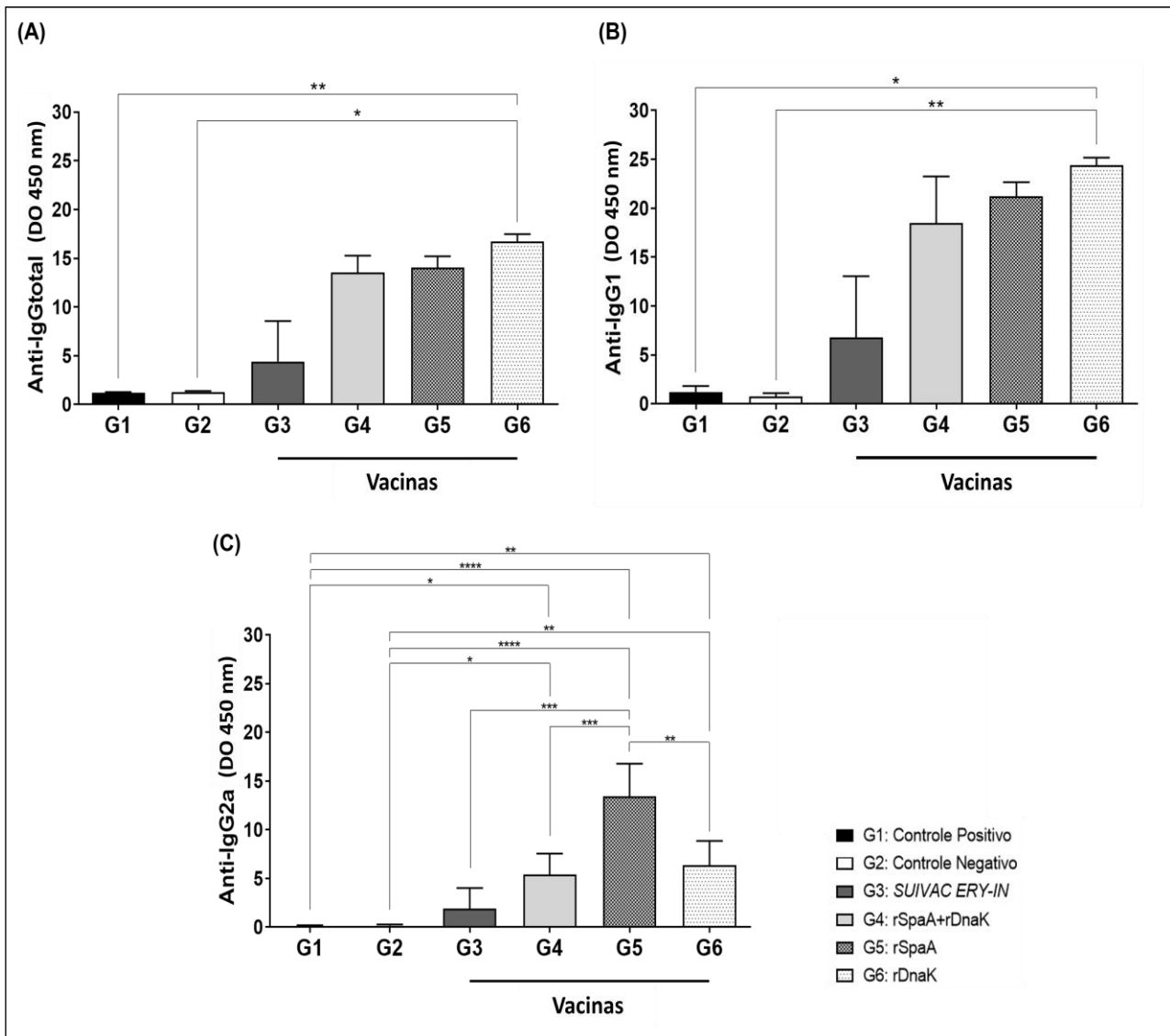


**Figura 22. Primeira curva de sobrevivência dos camundongos** . O tempo de sobrevivência dos camundongos foi monitorado durante 14 dias a partir do desafio com *E. rhusiopathiae* (dia 0).

#### **4.8. Segunda Análise do Efeito Imunogênico da rSpaA e rDnaK contra *E. rhusiopathiae***

Novamente após 3 dias do desafio com as bactérias, o soro dos camundongos de todos os grupos foi coletado. Tanto a rSpaA quanto a rDnaK mostraram novamente ter a capacidade de induzir uma resposta imune em camundongos contra a bactéria, por causa da presença de anticorpos anti-rSpaA e anti-rDnaK IgG de diferentes subtipos no soro dos animais dos grupos imunizados, indicando que as proteínas heterólogas rSpaA e rDnaK em G4, G5 e G6 foram imunogênicas e geraram uma resposta humoral específica (Figura 23).

Não houve diferença significativa na quantidade de anticorpos totais IgG ou IgG1 produzidos entre os grupos G4, G5 e G6 (Figura 23A e 23B), porém, podemos observar que na figura 23A o grupo vacinado com a rDnaK foi o único que apresentou um aumento significativo de IgG total quando comparado com o controle negativo, ocorrendo o mesmo com os resultados de IgG1. Quanto aos anticorpos IgG2a, todos os grupos imunizados mostraram uma produção significativamente maior desse anticorpo quando comparados aos grupos de controle, mas o grupo imunizado com rSpaA apresentou um IgG2a maior do que cada um dos outros grupos vacinados ou até mesmo o grupo imunizado com a vacina comercial SUIVAC (Figura 23C).

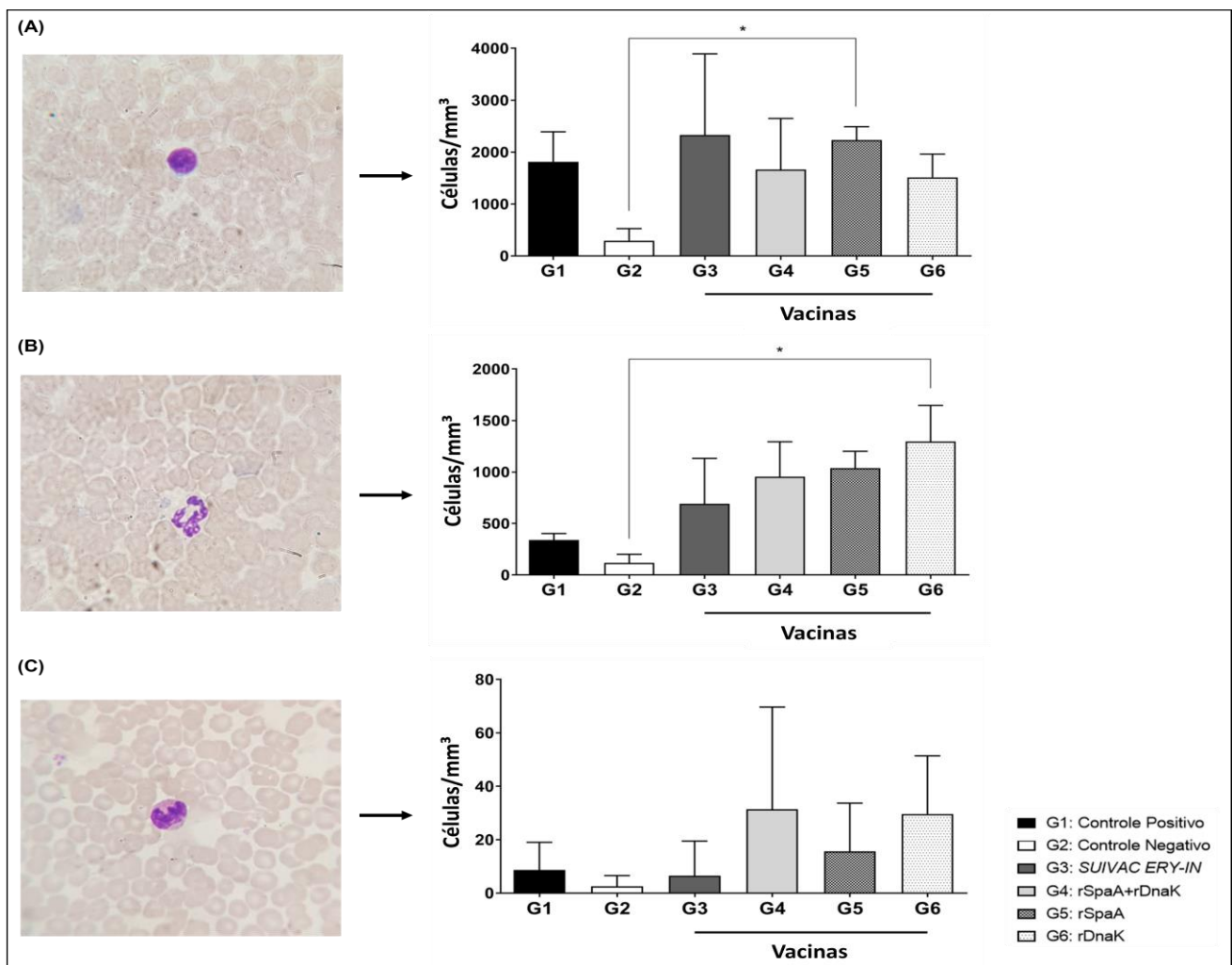


**Figura 23. Segundo ensaio de imunização.** Títulos totais de IgG, IgG1 e IgG2a no sangue de camundongos isogênicos, 3 dias após a infecção. As subclasses de anticorpos IgG no soro de cada 4 camundongos por grupo foram quantificadas indiretamente contra as proteínas antigênicas rSpaA e rDnaK. (A) Quantificação indireta de IgG total. (B) Quantificação indireta de IgG1. (C) Quantificação indireta de IgG2a. Os dados foram normalizados e representam a média de 4 animais. A diferença significativa dos grupos usando o teste não paramétrico One-way ANOVA foi representada por: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

#### 4.9. Análise do Perfil das Células Sanguíneas Periféricas após Imunização

O sangue de 4 camundongos de cada grupo foi analisado, no qual 100 células, subdivididas em células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foram contadas. Com base nos dados obtidos, foi observada a diferença no perfil das células sanguíneas presentes em cada grupo, em que podemos relatar que não houve

diferença significativa no número de células mononucleares entre os grupos vacinados, nem com o controle positivo. Porém, foi encontrada uma diferença significativa maior no número de células mononucleares do grupo imunizado com rSpaA do que no grupo somente desafiado (G2) (Figura 24A). Já na contagem de neutrófilos, um maior número significativo de células foi observado no grupo vacinado com rDnaK em comparação com o controle negativo (Figura 24B). A contagem de eosinófilos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos (Figura 24C).



**Figura 24. Morfologia e contagem de leucócitos no sangue de 4 camundongos isogênicos de todos os 6 grupos, 3 dias após a infecção.** Os esfregaços foram preparados através de extensão sanguínea e os leucócitos foram diferenciados de acordo com suas variedades morfológicas e quantidade no sangue periférico. (A) Morfologia e perfil das células mononucleares. (B) Morfologia e perfil dos neutrófilos. (C) Morfologia e perfil dos eosinófilos. \* $p < 0.05$  indica a diferença significativa entre os grupos.



#### 4.10. Colonização do Baço e Rim pela *E. rhusiopathiae* após Imunização de Camundongos

Para avaliar a biodistribuição foram coletados os baços devido a esse ser um órgão do sistema linfático, e os rins devido a alta eliminação da bactéria pela urina na fase aguda da doença.

Uma análise de biodistribuição de *E. rhusiopathiae* foi realizada nos baços e rins para avaliar a colonização desses órgãos pela bactéria nos diferentes grupos estudados. Quando os diferentes grupos foram comparados, o grupo G2, que foi desafiado com as bactérias sem imunização prévia, apresentou uma média de aproximadamente 200 colônias formadas nos rins (Figura 25A) e de 20 colônias nos baços analisados (Figura 25B). O grupo imunizado com SUIVAC não apresentou crescimento de colônias, enquanto o grupo rSpaA mostrou um crescimento mínimo de 1 a 2 colônias em ambos os órgãos. Já os grupos vacinados com a mistura rSpaA+rDnaK apresentaram crescimento médio de 50 colônias nos rins e 6 nos baços, e nos grupos vacinados somente com a rDnaK foram observados uma média de 20 colônias formadas nos rins e 4 nos baços analisados. Porém, a diminuição significativa das colônias formadas nos baços foi observada somente no controle positivo (G1), nos grupos vacinados com a SUIVAC e vacinados com a rSpaA (G3 e G5) quando comparadas ao grupo que foi somente desafiado (G2) (Figura 25).

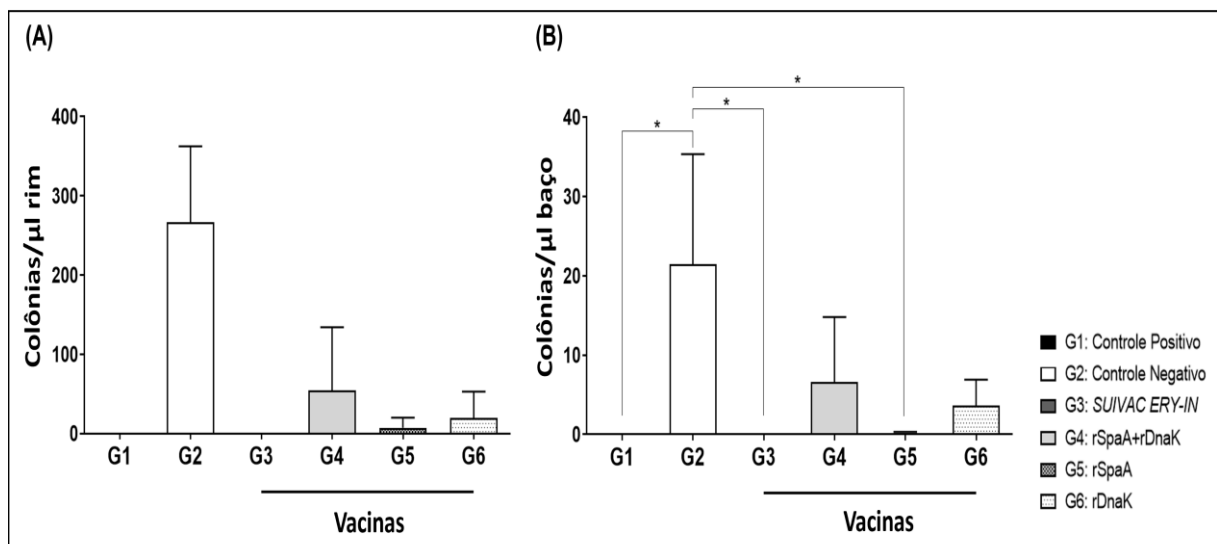
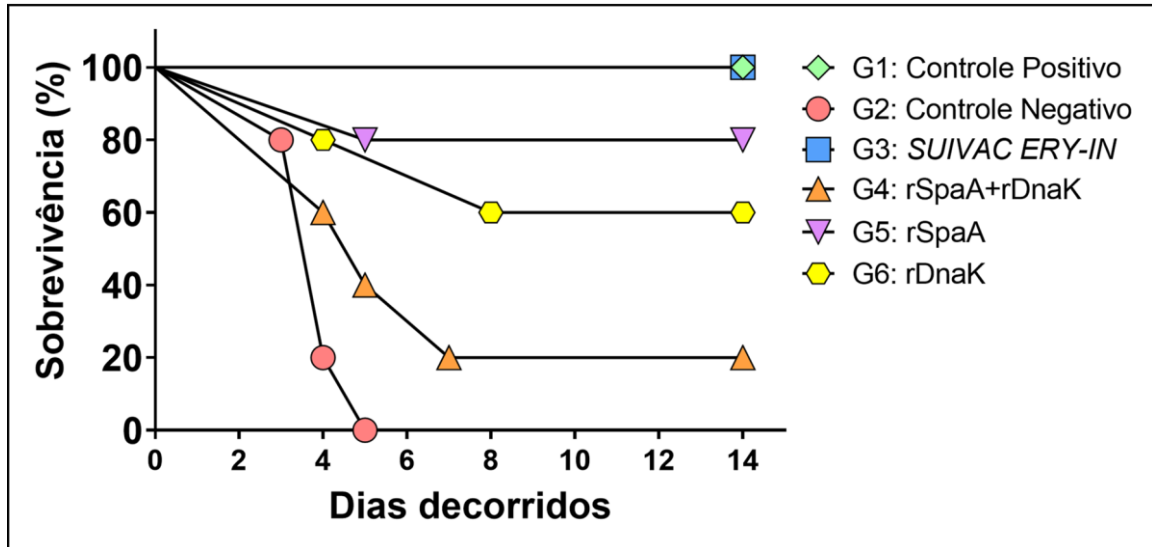


Figura 25. Biodistribuição dos órgãos rins e baço de animais heterogêneos, 3 dias após a infecção com 4000 células de *E. rhusiopathiae*. (A) 100 μl da amostra macerada do rim foi plaqueada

e diluída para  $10^2$  em 20 ml de meio LB sólido. (B) 100  $\mu$ l da amostra macerada do baço foi diluída para  $10^1$  em 20 ml de meio LB sólido. Os órgãos foram coletados de 3 animais de todos os seis grupos testados. Os dados foram normalizados e a diferença significativa dos grupos usando o teste não paramétrico One-way ANOVA foi representada por  $*p < 0,05$ .

#### **4.11. Segunda Análise do Efeito Protetor das Proteínas Recombinantes Contra a Erisipela**

Para o ensaio de proteção contra a erisipela, durante um período de 14 dias, foi monitorado o aparecimento de sintomas como febre, fraqueza, olhos fechados e apatia em cada grupo. Os camundongos não vacinados e desafiados (grupo G2) apresentaram os sintomas iniciais da doença no terceiro dia após o desafio, e todos os animais do grupo morreram no quinto dia. Enquanto os camundongos do grupo G2 morreram em até 5 dias, os do grupo G4, imunizados com as duas proteínas recombinantes, apresentaram um atraso nos sintomas da doença em 60% dos camundongos, ou mesmo uma proteção completa em 20% deles, que não apresentaram nenhum sintoma. O Grupo G5 (imunizado com rSpaA) mostrou um efeito protetor para 80% dos camundongos (apenas 20% morreram). O Grupo G6 (imunizado com rDnaK) imunizou com sucesso 60% dos camundongos (40% morreram); no entanto, o início dos sintomas em um animal foi adiado e só foi observado no oitavo dia após o desafio (Figura 26). Todos os camundongos que morreram mostraram fraqueza, postura encurvada, mobilidade reduzida, pelagem comprometida (febre) e olhos parcialmente fechados de 1 a 2 dias antes da morte.



**Figura 26. Segunda curva de sobrevivência de camundongos.** O tempo de sobrevivência dos camundongos foi monitorado por 14 dias após o desafio com 100  $\mu$ l de 4000 células de *E. rhusiopathiae* NCTC11002 (dia 0), as células foram inoculadas por via subcutânea e o grupo Controle positivo recebeu apenas PBS 1X. Na legenda, o Controle positivo não foi imunizado nem desafiado; o Controle negativo apenas foi desafiado e os demais grupos representam o agente imunogênico utilizado em camundongos que posteriormente também foram desafiados com as bactérias.

## 5. DISCUSSÃO

A busca por alvos imunogênicos que possam contribuir para o desenvolvimento de vacinas tem levado a estudos inovadores e ferramentas para identificar proteínas promissoras. Neste estudo, as proteínas SpaA e DnaK de *E. rhusiopathiae* foram expressas em ClearColi para avaliar seu potencial como vacina para o controle da erisipela suína, tanto separadamente quanto em conjunto para a imunização, em condições que diminuem a contaminação das proteínas com LPS, produzindo proteínas com melhor qualidade para a estimulação imunogênica.

A ClearColi, como a *E. coli* BL21 (DE3) comum, expressa proteínas utilizando o sistema pET, como do vetor pET28a(+), e IPTG (análogo a lactose) como indutor da expressão a partir do promotor *lac* para expressão da enzima T7 RNA polimerase (STUDIER & MOFFATT, 1986), porém não produz as endotoxinas presentes na *E. coli*, como o LPS.

Dessa forma, sabendo das limitações das vacinas celulares e das vacinas comerciais atualmente existentes, direcionamos a investigação para avaliar o perfil das proteínas recombinantes produzidas em bactérias livre de LPS, ClearColi™, e como esse vetor de expressão poderia contribuir para a qualidade dessas proteínas.

As proteínas recombinantes expressas foram purificadas neste trabalho por meio de IMAC, no qual a presença da *His-Tag* expressa na região N-terminal da rDnaK e na C-terminal da rSpaA aumentou a interação com o metal imobilizado, neste caso o níquel. As moléculas de proteína adsorvidas foram eluídas por competição pelo metal de espécies doadoras de elétrons como o imidazol ou por protonação dos grupos de imidazol das histidinas na proteína adsorvida, devido à redução do pH do tampão de eluição (BRESOLIN *et al.*, 2010). Esse último método foi testado pois, sem o imidazol normalmente utilizado para eluir as proteínas, não seria necessária posterior remoção desse reagente do inóculo contendo as proteínas recombinantes, já que é um produto tóxico para ser inoculado em animais.

Apesar de passar pela purificação por IMAC, a rDnaK ainda apresentou proteínas contaminantes de menor peso molecular, que só foram retiradas através da SEC. Essa técnica consiste na separação das moléculas de acordo com o tamanho, em que uma solução da amostra passa por uma coluna preenchida com um material

poroso, se deslocando ao longo da coluna pelo solvente e retendo por mais tempo moléculas de menor tamanho do que as maiores, que são eluídas da coluna mais rapidamente (KOSTANSKI *et al.*, 2004). Assim, foi possível separar adequadamente a rDnaK de outras proteínas contaminantes e aumentar sua pureza, melhorando conseqüentemente sua capacidade de imunogenicidade.

Devido a rSpaA se encontrar insolúvel e ser necessária primeiramente estar solubilizada para passar pela purificação, foram testados dois agentes de solubilização, cloridrato de guanidina e uréia, porém a primeira foi tóxica para os camundongos. Ainda, Teramoto e colaboradores (1981) relataram que uma concentração de até 2000 mg/kg de uréia administrada via oral em camundongos, não induziu sintomas de toxicidade. Por isso, somente a uréia foi usada para solubilizar a rSpaA destinada aos ensaios de imunização, sendo que para os nossos testes aproximadamente 36 mg de uréia foram inoculadas em cada camundongo (peso 20 g).

As rSpaA e rDnaK purificadas foram usadas para compor uma vacina de subunidade. Segundo LILJEQVIST; STAHL (1999), esse tipo de vacina deve ser formada por frações purificadas de um patógeno, como proteínas capazes de induzir uma resposta imune, sendo segura para uso desde que os métodos de extração resultem em um produto puro e isento de toxicidade.

Na literatura, vários autores utilizaram diferentes vias de administração, números de doses e quantidades de proteína para a imunização de camundongos contra diferentes doenças. Yang *et al.* (2017) utilizaram 30 µg de proteínas recombinantes totais, inoculadas intramuscularmente, para constituir uma vacina contra pneumonia em camundongos com queimaduras. Kim *et al.* (2018) testaram uma vacina contra *Mycobacterium tuberculosis* composta por 10 µg de proteínas totais, administradas em 3 doses pela via subcutânea.

Para a erisipela suína, também há relatos de imunização de camundongos utilizando proteínas de *E. rhusiopathiae*, como CbpB (SHI *et al.*, 2013), uma GAPDH (ZHU *et al.*, 2018) e a proteína de superfície SpaA. Imada *et al.* (1999) e To & Nagai (2007) testaram, respectivamente, 50 µg e 40 µg da proteína SpaA em seus ensaios de imunização, todos utilizando a via de administração subcutânea. Borrathybay *et al.* (2015) utilizaram 100 µg de proteína SpaA (por via subcutânea) para analisar o grau

de imunização dessa proteína. Assim, para o primeiro ensaio de imunização, cada camundongo nos grupos de teste foi inoculado via subcutânea com 40 µg de proteínas totais, e no segundo ensaio os animais foram imunizados com 100 µg de proteínas recombinantes, administradas via intramuscular. Para que a proteção fornecida pelas proteínas fosse avaliada contra uma alta dose de infecção, o desafio foi realizado com 4000 células da bactéria, tanto para o primeiro quanto para o segundo ensaio de imunização, uma vez que a DL<sub>50</sub> corresponde a 1000 células.

A imunidade humoral e celular desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção por *E. rhusiopathiae*, mas a imunidade humoral desempenha um papel crítico, já que o tratamento com soro antiespecífico oferece controle da doença (YOKOMIZO & ISAYAMA, 1972). No Japão, a rSpaA já é utilizada como vacina de subunidade para suínos sob os nomes comerciais SUIIMUGEN®rART2/ER (KM Biologics Co., Ltd.) e Swivac ERA (Kyoritsu Seiyaku Corp.) (OPRIESSNIG *et al.*, 2020), porém ainda não existe uma vacina totalmente protetora para a erisipela suína. Portanto, neste trabalho, uma das primeiras características avaliadas foi a indução de anticorpos específicos de IgG para rSpaA e rDnaK no modelo murino de erisipela.

Tanto no primeiro, quanto no segundo experimento de imunização, um título mais elevado de IgG contra as proteínas recombinantes foi detectado no soro dos camundongos inoculados com as proteínas recombinantes, em comparação com os controles. Isso indica que as proteínas rSpaA e rDnaK purificadas foram imunogênicas, gerando uma resposta imune específica do tipo humoral. Esses dados corroboram o estudo de Cheun *et al.* (2004) e Camillo (2015), que mostraram uma alta produção de anticorpos IgG contra a proteína rSpaA no soro de camundongos imunizados com a proteína SpaA carregada em um vetor vivo *Lactococcus lactis* ou como proteína purificada e inoculada via intramuscular, respectivamente. Shimoji *et al.* (2002a) também relataram uma alta produção de anticorpos IgG anti-rSpaA no soro de porcos imunizados com duas doses de uma cepa atenuada de *E. rhusiopathiae*, em comparação com o soro de porcos imunizados com apenas uma dose, e também no soro de porcos não imunizados.

Outros estudos relataram a atividade imunogênica e protetora da DnaK em outras bactérias, como os trabalhos de Delpino *et al.* (2007) e Hu *et al.* (2012), que

demonstraram a o aumento da produção de anticorpos e ação protetora de vacinas bivalentes, compostas com DnaK de *Brucella* sp e *Edwardsiella tarda*, contra as doenças respectivas causadas por esses microorganismos.

O aumento de IgG específico contra as proteínas rSpaA e rDnaK indica que elas foram antigênicas, enquanto uma mudança na classe de IgG para IgG1 ou IgG2a pode indicar que cada proteína induziu a resposta imune dos animais de maneiras diferentes. Podemos relacionar os níveis relativos das subclasses de IgG ao padrão na resposta imune dos linfócitos T, Th1 ou Th2, e às interleucinas produzidas pelos camundongos desafiados. A mudança para IgG1 é induzida pela interleucina IL-4, que também inibe a mudança para IgG2a, e é responsável por estimular uma resposta humoral (Th2), onde há prevalência de IgG1. A mudança para IgG2a e a inibição da mudança de subclasse para IgG1 são estimuladas pelo interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que também é responsável por induzir uma resposta imune mediada por células (Th1) (SNAPPER & PAUL, 1987; STEVENS *et al.*, 1988).

Analisando diferentes subclasses de anticorpos, IgG1 e IgG2a, a rDnaK induziu níveis mais altos de IgG1, que é a subclasse mais abundante e normalmente está relacionada a respostas a vírus, proteínas solúveis e antígenos de membrana, enquanto a rSpaA estimulou um nível mais alto de IgG2a, responsável por respostas contra polissacarídeos capsulares bacterianos e, menos frequentemente, contra antígenos proteicos (FERRANTE *et al.*, 1990; VIDARSSON *et al.*, 2014). Entender o perfil de imunogenicidade é fundamental para o sucesso de uma vacina, já que um maior produção de anticorpos neutralizantes são na maioria um efeito da resposta tipo Th2.

No entanto, para uma doença infecciosa, além da imunidade Th2 que é mais humoral, também é importante uma ativação celular efetora mais regulada pela resposta imune Th1. Um fator de virulência de *E. rhusiopathiae* está associado à resistência à fagocitose por neutrófilos e macrófagos, e essa habilidade está intimamente relacionada à presença de uma cápsula de polissacarídeo em sua superfície celular (TIMONEY, 1970a; SHIMOJI *et al.*, 1994; SHIMOJI *et al.*, 1996). Portanto, foi analisado como as vacinas testadas modularam o sistema imunológico dos camundongos vacinados.

A rSpaA proporcionou uma maior quantidade de células mononucleadas (monócitos e linfócitos) quando comparada com camundongos desafiados e não imunizados. Esses monócitos são responsáveis pela fagocitose das bactérias invasoras, e os linfócitos formam anticorpos e células de memória necessárias para a constituição da imunidade adaptativa e conseqüentemente de uma resposta imune mais rápida (SHIMOJI, 2000). A proteína rDnaK proporcionou um aumento nos neutrófilos no sangue periférico dos animais imunizados, também quando comparados com camundongos desafiados e não imunizados, sendo os neutrófilos responsáveis pela fagocitose de patógenos, assim como os monócitos, mas eles permanecem circulando no sangue por um curto período de tempo e induzem uma resposta imune mais lenta devido a não formarem células de memória (SHIMOJI, 2000).

A biodistribuição de *E. rhusiopathiae* no baço e rim direito dos camundongos confirmou que as proteínas rSpaA e rDnaK ajudaram o sistema imunológico a prevenir a proliferação das bactérias nesses órgãos, mas rSpaA foi mais eficiente, pois inibiu a proliferação das bactérias no rim e no baço, uma vez que somente 1 ou 2 UFCs foram observadas nas placas dos órgãos macerados. Também neste experimento, as proteínas recombinantes foram mais eficazes quando inoculadas separadamente, visto que os camundongos vacinados com as proteínas usadas em conjunto (rSpaA+rDnaK) mostraram um maior número de colônias que cresceram e foram distribuídas nos órgãos analisados.

Uma análise também foi realizada para verificar a atividade protetora das proteínas rSpaA, rDnaK e rSpaA+rDnaK. Nos grupos testados do segundo ensaio, a proteína rSpaA proporcionou maior proteção aos camundongos quando comparada com rDnaK e com as duas proteínas juntas (rSpaA+rDnaK), protegendo 80% dos animais contra a erisipela. Isso indica que SpaA é uma proteína promissora para a composição de uma vacina de subunidade, como já relatado nos trabalhos de To & Nagai (2007); Borrathybay (2015) e Zhu (2018), nos quais SpaA promoveu 100% de proteção de camundongos desafiados com *E. rhusiopathiae*.

Além disso, as duas proteínas quando inoculadas juntas (rSpaA+rDnaK) forneceram o menor efeito protetor analisado neste trabalho, protegendo apenas 20% dos camundongos, corroborando com os dados da curva de sobrevivência do primeiro



ensaio, no qual sobreviveram aproximadamente 33.33% dos animais. Por outro lado, a rDnaK induziu um efeito protetor parcial protegendo 60% dos camundongos, mas também retardou o início dos sintomas da doença e a morte dos animais, mostrando que protegeu mais quando foi utilizada separadamente do que quando as duas proteínas foram usadas em conjunto.

Embora a imunidade humoral seja muito importante para a defesa do hospedeiro, a fagocitose por mononucleados também desempenha um papel fundamental na eliminação de *E. rhusiopathiae* (TIMONEY, 1970a; b). Também podemos observar nesse trabalho a importância tanto da imunidade celular quanto da humoral, uma vez que a proteína que estimulou mais mononucleados, rSpaA, apresentou uma resposta imune mais rápida, um maior percentual de animais protegidos e uma menor quantidade de UFC isoladas do rim e baço, em comparação com rDnaK.

Esses dados corroboram a maior quantidade de IgG2a induzida por rSpaA, o que sugere uma maior estimulação da resposta Th1 do que a por rDnaK, ativando a resposta celular e estimulando macrófagos, e outras células fagocitárias para o controle da infecção. Ou ainda, devido a estimulação de uma resposta Th1 induzida pela rSpaA, houve a ativação de linfócitos T citotóxicos necessários para a eliminação da bactéria devido a sua resistência a fagocitose dentro dos macrófagos (SHIMOJI *et al.*, 1996; OSTERLOH, 2022), impedindo sua propagação no organismo.

Ainda, quando comparamos a imunização com as proteínas recombinantes com a vacina comercial (celular), podemos observar que os resultados da biodistribuição dos órgãos, do perfil de células sanguíneas periféricas e da curva de sobrevivência apresentados somente pela rSpaA, foram os que mais se aproximaram dos resultados obtidos com a vacina de referência *SUIVAC ERY- IN* nesses mesmos experimentos, a qual teve a maior porcentagem de proteção nos experimentos.

## 6. CONCLUSÃO

A atividade protetora da proteína rSpaA já é mencionada na literatura e foi corroborada nos nossos experimentos.

Foi demonstrado neste trabalho que a proteína DnaK de *E. rhusiopathiae* possui atividade imunogênica, induzindo a produção de anticorpos IgG específicos em camundongos. É importante enfatizar que a caracterização protetora de rDnaK foi realizada pela primeira vez neste estudo, a qual retardou o início dos sintomas e protegeu completamente 60% dos animais vacinados e desafiados, provando ser uma nova proteína promissora para a constituição de uma vacina de subunidade contra *E. rhusiopathiae*.

As proteínas rSpaA e rDnaK foram mais eficazes como vacina quando usadas separadamente do que em conjunto, indicando que uma não potencializa o efeito protetor da outra, sendo necessário o reajuste da concentração das duas proteínas quando aplicadas em conjunto (aumentar a concentração de rSpaA e diminuir a de rDnaK) para que o efeito protetor possa melhorar. E ainda que a vacina comercial tenha obtido uma maior porcentagem de proteção dos camundongos, os resultados com apenas as duas proteínas recombinantes foram promissores quando os comparamos com uma vacina celular que proporciona vários antígenos diferentes estimulando o sistema imune.

Assim, este estudo demonstra que a imunidade protetora eficaz contra *E. rhusiopathiae* é um conjunto de eventos que ocorrem durante o processo de apresentação de antígenos, células efetoras contra antígenos e produção de anticorpos capazes de controlar a infecção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology** Elsevier, 2017, v.9.

ABCS. Panorama da Produção de Suínos no Brasil e no Mundo. In: (Ed.). **Produção de Suínos: Teoria e Prática**. Brasília, DF, 2014.

ALBERTON, G. C.; BANDARRA, E. P.; PIFFER, I.; MORES, M. A. Z.; PEREIRA, M. A. C.; YAMAMOTO, M. T. Exame Anatomopatológico, Microbiológico, Citológico e Físico-Químico das Articulações de Suínos Artríticos no Matadouro. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 81-91, 2003.

ASLANI, M. R.; EBRAHIMI KAHRISANGI, A.; BAGHBAN, F.; KAZEMI, A.; HEIDARI, M.; SALEHI, N. Endocarditis associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* in a fat-tailed ram. **Iran J Vet Res**, v. 16, n. 3, p. 310-312, 2015.

BENDER, J. S.; SHEN, H. G.; IRWIN, C. K.; SCHWARTZ, K. J.; OPRIESSNIG, T. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1605-1611, 2010.

BOLHASSANI, A.; RAFATI, S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. **Expert Rev Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1185-1199, 2008.

BORRATHYBAY, E.; GONG, F. J.; ZHANG, L.; NAZIERBIEKE, W. Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065. **J Microbiol Biotechnol**, v. 25, n. 2, p. 206-216, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BRESOLIN, I. T.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W. M.; AUGUSTO, E. F.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; BUENO, S. M. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG(1) monoclonal antibodies purification: the effect of chelating ligand and support. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, n. 7, p. 2148-2165, 2010.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 789-799, 1999a.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **Journal of medical microbiology** v. 48, n. 9, p. 789-799, 1999b.

CAMILLO, L. **Efeito da imunização com vacina recombinante do antígeno de superfície SpaA de Erysipelothrix rhusiopathia -modelo murino**. Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), Faculdade Federal de São Carlos (UFScar), São Carlos (SP), 2015.

CHERNECKY, C. C.; BERGER, B. J. **Laboratory Tests and Diagnostic Procedures**: Elsevier Saunders, 2013, v.6.

CHEUN, H. I.; KAWAMOTO, K.; HIRAMATSU, M.; TAMAOKI, H.; SHIRAHATA, T.; IGIMI, S.; MAKINO, S. I. Protective immunity of SpaA-antigen producing Lactococcus lactis against Erysipelothrix rhusiopathiae infection. **J Appl Microbiol**, v. 96, n. 6, p. 1347-1353, 2004.

COUTINHO, T. A.; IMADA, Y.; DE BARCELLOS, D. E.; DE OLIVEIRA, S. J.; MORENO, A. M. Genotyping of Brazilian Erysipelothrix spp. strains by amplified fragment length polymorphism. **J Microbiol Methods**, v. 84, n. 1, p. 27-32, 2011.

DA SILVA, A. J.; DA COSTA IEMMA, M. R.; LUPERNI HORTA, A. C.; SARGO, C. R.; DE LIMA CAMARGO GIORDANO, R.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; ZANGIROLAMI, T. C.; MARQUES NOVO, M. T. Cloning, auto-induction expression, and purification of rSpaA swine erysipelas antigen. **Curr Microbiol**, v. 65, n. 4, p. 369-374, 2012.

DELPINO, M. V.; ESTEIN, S. M.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C.; CASSATARO, J. Vaccination with Brucella recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against Brucella abortus infection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 37-38, p. 6721-6729, 2007.

EAMENS, G. J.; FORBES, W. A.; DJORDJEVIC, S. P. Characterisation of Erysipelothrix rhusiopathiae isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. **Vet Microbiol**, v. 115, n. 4, p. 329-338, 2006.

FAO. <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>, 2017.

FERRANTE, A.; BEARD, L. J.; FELDMAN, R. G. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. **Pediatr Infect Dis J**, v. 9, n. 8 Suppl, p. S16-24, 1990.

FRANZ, B.; DAVIES, M. E.; HORNER, A. Localization of viable bacteria and bacterial antigens in arthritic joints of Erysipelothrix rhusiopathiae-infected pigs. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 12, n. 2, p. 137-142, 1995.

GALAN, J. E.; TIMONEY, J. F. Cloning and expression in Escherichia coli of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. **Infect Immun**, v. 58, n. 9, p. 3116-3121, 1990.

GARTRELL, B. D.; ALLEY, M. R.; MACK, H.; DONALD, J.; MCINNES, K.; JANSEN, P. Erysipelas in the critically endangered kakapo (*Strigops habroptilus*). **Avian Pathol**, v. 34, n. 5, p. 383-387, 2005.

GERBER, P. F.; MACLEOD, A.; OPRIESSNIG, T. Erysipelothrix rhusiopathiae serotype 15 associated with recurring pig erysipelas outbreaks. **Vet Rec**, v. 182, n. 22, p. 635, 2018.

GROSCHUP, M. H.; TIMONEY, J. F. Modified Feist broth as a serum-free alternative for enhanced production of protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 11, p. 2573-2575, 1990.

HARADA, K.; FURUI, Y.; TAKAHASHI, T. Spa type of Erysipelothrix strains and its association with virulence of Erysipelothrix strains in mice and swine. **African Journal of Microbiology Research**, v. 43, n., p. 7123-7127, 2012.

HOCHULI, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. **J Chromatogr**, v. 444, n., p. 293-302, 1988.

HU, Y. H.; DANG, W.; DENG, T.; SUN, L. Edwardsiella tarda DnaK: expression, activity, and the basis for the construction of a bivalent live vaccine against E. tarda and Streptococcus iniae. **Fish Shellfish Immunol**, v. 32, n. 4, p. 616-620, 2012.

IMADA, Y.; GOJI, N.; ISHIKAWA, H.; KISHIMA, M.; SEKIZAKI, T. Truncated surface protective antigen (SpaA) of Erysipelothrix rhusiopathiae serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4376-4382, 1999.

IMADA, Y.; MORI, Y.; DAIZOH, M.; KUDOH, K.; SAKANO, T. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5015-5021, 2003.

IMADA, Y.; TAKASE, A.; KIKUMA, R.; IWAMARU, Y.; AKACHI, S.; HAYAKAWA, Y. Serotyping of 800 strains of Erysipelothrix isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2121-2126, 2004.

INGEBRITSON, A. L.; ROTH, J. A.; HAUER, P. J. Erysipelothrix rhusiopathiae: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. **Vaccine**, v. 28, n. 13, p. 2490-2496, 2010.

JEONG, H.; KIM, H. J.; LEE, S. J. Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. **Genome Announc**, v. 3, n. 2, p., 2015.

KAPLAN, E. L., MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

KIM, S. W.; CHOI, I. H.; KIM, S. N.; KIM, Y. H.; PYO, S. N.; RHEE, D. K. Molecular cloning, expression, and characterization of dnaK in *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 161, n. 2, p. 217-224, 1998.

KIM, W. S.; KIM, J. S.; KIM, H. M.; KWON, K. W.; EUM, S. Y.; SHIN, S. J. Comparison of immunogenicity and vaccine efficacy between heat-shock proteins, HSP70 and GrpE, in the DnaK operon of *Mycobacterium tuberculosis*. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14411, 2018.

KOCH, R. **Investigations into the etiology of traumatic infective diseases**. London: New Sydenham Society, 1878.

KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography-a review of calibration methodologies. **J Biochem Biophys Methods**, v. 58, n. 2, p. 159-186, 2004.

KRSKA, J.; ELTHON, T.; BLUM, P. Monoclonal antibody recognition and function of a DnaK (HSP70) epitope found in gram-negative bacteria. **J Bacteriol**, v. 175, n. 20, p. 6433-6440, 1993.

KUTZ, S.; BOLLINGER, T.; BRANIGAN, M.; CHECKLEY, S.; DAVISON, T.; DUMOND, M.; ELKIN, B.; FORDE, T.; HUTCHINS, W.; NIPTANATIAK, A.; ORSEL, K. Erysipelothrix rhusiopathiae associated with recent widespread muskox mortalities in the Canadian Arctic. **Can Vet J**, v. 56, n. 6, p. 560-563, 2015.

KWOK, A. H.; LI, Y.; JIANG, J.; JIANG, P.; LEUNG, F. C. Complete genome assembly and characterization of an outbreak strain of the causative agent of swine erysipelas--*Erysipelothrix rhusiopathiae* SY1027. **BMC Microbiol**, v. 14, n., p. 176, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LE MARECHAL, C.; JARDIN, J.; JAN, G.; EVEN, S.; PULIDO, C.; GUIBERT, J. M.; HERNANDEZ, D.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J.; DEMON, D.; MEYER, E.; BERKOVA, N.; THIERY, R.; VAUTOR, E.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. **Vet Res**, v. 42, n., p. 35, 2011.

LI, Y.; ZOU, Y.; XIA, Y.; BAI, J.; WANG, X.; JIANG, P. Proteomic and Transcriptomic Analyses of Swine Pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* Reveal Virulence Repertoire. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0159462, 2016.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **J Biotechnol**, v. 73, n. 1, p. 1-33, 1999.

LOEFFLER, F. A. Experimentelle Untersuchungen über Schweinerotlauf. **Arb Kais Gesundh**, v. 1, n., p. 46-55, 1886.

LUCIGEN. **ClearColi® K-12 Electrocompetent Cells**, 2016.

MAKINO, S.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T.; ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, M.; EZAKI, T.; MORITA, H. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 6, p. 1526-1531, 1994.

MAKINO, S.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, S.; SHIRAHATA, T.; UEMURA, K.; SAWADA, T.; WAKAMOTO, H.; MORITA, H. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Microb Pathog**, v. 25, n. 2, p. 101-109, 1998.

MAKINO, S. I.; YAMAMOTO, K.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T. Surface antigen, SpaA, of *erysipelo*thrix *rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. **FEMS Microbiol Lett**, v. 186, n. 2, p. 313-317, 2000.

MCNEIL, M.; GERBER, P. F.; THOMSON, J.; WILLIAMSON, S.; OPRIESSNIG, T. Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015). **Vet J**, v. 225, n., p. 13-15, 2017.

MORAES, J. B. **Clonagem, Expressão e Avaliação do Potencial Antígeno Vacinal Contra a Erisipela Suína**. Curso de Biotecnologia, Faculdade Federal de São Carlos (UFScar), São Carlos (SP), 2015.

MORIMOTO, M.; KATO, A.; KOJIMA, H.; AKAIKE, Y.; NOGAMI, K.; SASAKAWA, C.; NAGAI, S.; TO, H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. **Curr Microbiol**, v. 78, n. 1, p. 55-66, 2021.

NADIS. <http://www.nadis.org.uk/bulletins/erysipelas.aspx>, 2023.

NAKATO, H.; SHINOMIYA, K.; MIKAWA, H. Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to cultured rat aortic endothelial cells. Role of bacterial neuraminidase in the induction of arteritis. **Pathol Res Pract**, v. 182, n. 2, p. 255-260, 1987.

NELSON, D. L. C., M. M. **Pricípios de Bioquímica de Lehninger**: Artmed, 2014  
NEUMANN, E. J.; GRINBERG, A.; BONISTALLI, K. N.; MACK, H. J.; LEHRBACH, P. R.; GIBSON, N. Safety of a live attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine for swine. **Vet Microbiol**, v. 135, n. 3-4, p. 297-303, 2009.

OGAWA, Y.; SHIRAIWA, K.; OGURA, Y.; OOKA, T.; NISHIKAWA, S.; EGUCHI, M.; HAYASHI, T.; SHIMOJI, Y. Clonal Lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Responsible for Acute Swine Erysipelas in Japan Identified by Using Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 11, p., 2017.

OLIVEIRA, S. J.; RODRIGUES, P. R. C.; LUNGE, V. R.; SILVA JUNIOR, V. B. Erisipela suína: isolamento de *Erysipelothrix* spp de amígdalas de animais de abate e

realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos. **Veterinária em Foco**, v., n. 3, p. 5-10, 2005.

OLIVEIRA, S. J. Swine erysipelas: an important problem to pig production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n., p. 97-104, 2009.

OPRIESSNIG, T.; FORDE, T.; SHIMOJI, Y. Erysipelothrix Spp.: Past, Present, and Future Directions in Vaccine Research. **Front Vet Sci**, v. 7, n., p. 174, 2020.

OSTERLOH, A. Vaccination against Bacterial Infections: Challenges, Progress, and New Approaches with a Focus on Intracellular Bacteria. **Vaccines (Basel)**, v. 10, n. 5, p., 2022.

PARTRIDGE, J.; KING, J.; KRSKA, J.; ROCKABRAND, D.; BLUM, P. Cloning, heterologous expression, and characterization of the Erysipelothrix rhusiopathiae DnaK protein. **Infect Immun**, v. 61, n. 2, p. 411-417, 1993.

PELLIZA, B. R.; CARRANZA, A. I.; DI COLA, G.; AMBROGI, A. Monitoramento das patologias em suínos no período de crescimento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 59, n., p. 418-422, 2007.

PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; GOMES, M. J. P.; BANDARRA, P. M.; LEAL, J. S.; PEDROSO, P. M. O.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Lesões de pele causadas por Erysipelothrix rhusiopathiae em um feto suíno abortado. **Ciência Rural**, v. 37, n., p. 1475-1479, 2007.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-Candida antibodies in serum. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 1, p. M110 004010, 2011.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, n., p. 635-700, 2002.

REBOLI, A. C.; FARRAR, W. E. Erysipelothrix rhusiopathiae: an occupational pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 2, n. 4, p. 354-359, 1989.

RENZ, H.; GENTZ, U.; SCHMIDT, A.; DAPPER, T.; NAIN, M.; GEMSA, D. Activation of macrophages in an experimental rat model of arthritis induced by Erysipelothrix rhusiopathiae infection. **Infect Immun**, v. 57, n. 10, p. 3172-3180, 1989.

REZANIA, S.; AMIRMOZAFFARI, N.; TABARRAEI, B.; JEDDI-TEHRANI, M.; ZAREI, O.; ALIZADEH, R.; MASJEDIAN, F.; ZARNANI, A. H. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi. **Avicenna J Med Biotechnol**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2011.

ROMAN, E.; MORENO, C. Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp 70 elicit peptide-specific T-cell responses in vivo. **Immunology**, v. 88, n. 4, p. 487-492, 1996.



SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, v.3.

SAMUELSON, J. C. Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. **Methods Mol Biol**, v. 705, n., p. 195-209, 2011.

SATO, H.; HIROSE, K.; SAITO, H. Protective activity and antigenic analysis of fractions of culture filtrates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Vet Microbiol**, v. 43, n. 2-3, p. 173-182, 1995.

SHI, F.; OGAWA, Y.; SANO, A.; HARADA, T.; HIROTA, J.; EGUCHI, M.; OISHI, E.; SHIMOJI, Y. Characterization and identification of a novel candidate vaccine protein through systematic analysis of extracellular proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Infect Immun**, v. 81, n. 12, p. 4333-4340, 2013.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T.; MORI, Y.; KUBO, M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. **Infect Immun**, v. 62, n. 7, p. 2806-2810, 1994.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; MORI, Y. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p. 1789-1793, 1996.

SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; SEKIZAKI, T.; SHIBAHARA, T.; YOKOMIZO, Y. Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: use of excision of Tn916 to inactivate a target gene. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3250-3254, 1998.

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes and Infection**, v. 2, n., p. 965-972, 2000.

SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; KITAJIMA, T.; MUNETA, Y.; SHIMIZU, S.; MORI, Y. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 226-232, 2002a.

SHIMOJI, Y.; ASATO, H.; SEKIZAKI, T.; MORI, Y.; YOKOMIZO, Y. Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. **J Vet Med Sci**, v. 64, n. 2, p. 173-176, 2002b.

SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; OSAKI, M.; KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MIKAMI, T.; SEKIZAKI, T. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. **J Bacteriol**, v. 185, n. 9, p. 2739-2748, 2003.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-947, 1987.

STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; VITETTA, E. S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-258, 1988.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.

SUZUE, K.; YOUNG, R. A. Heat shock proteins as immunological carriers and vaccines. **EXS**, v. 77, n., p. 451-465, 1996.

SWAN, R. A.; LINDSEY, M. J. Treatment and control by vaccination of erysipelas in farmed emus (*Dromaius novohollandiae*). **Aust Vet J**, v. 76, n. 5, p. 325-327, 1998.

TAKAHASHI, T.; SAWADA, T.; MURAMATSU, M.; TAMURA, Y.; FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; MITSUOKA, T. Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 536-539, 1987.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; UMENO, A.; KOZASA, T.; YAMAMOTO, K.; SAWADA, T. A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. **Microbiol Immunol**, v. 52, n. 10, p. 469-478, 2008.

TANG, H. B.; XIE, J.; WANG, L.; LIU, F.; WU, J. Complete genome sequence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain GXBY-1 isolated from acute swine erysipelas outbreaks in south China. **Genom Data**, v. 8, n., p. 70-71, 2016.

TERAMOTO, S.; KANEDA, M.; AOYAMA, H.; SHIRASU, Y. Correlation between the molecular structure of N-alkylureas and N-alkylthioureas and their teratogenic properties. **Teratology**, v. 23, n. 3, p. 335-342, 1981.

TIMONEY, J. The effect of de complementation on *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in the mouse. **Immunology**, v. 19, n. 4, p. 561-567, 1970a.

TIMONEY, J. The inactivation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pig buffy-coat leucocytes. **Res Vet Sci**, v. 11, n. 2, p. 189-190, 1970b.

TISHLER, M.; SHOENFELD, Y. Vaccination may be associated with autoimmune diseases. **Isr Med Assoc J**, v. 6, n. 7, p. 430-432, 2004.

TO, H.; NAGAI, S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 7, p. 813-820, 2007.

TO, H.; SATO, H.; TAZUMI, A.; TSUTSUMI, N.; NAGAI, S.; IWATA, A.; NAGANO, T. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 74, n. 7, p. 949-953, 2012.

UCHIYAMA, M.; YAMAMOTO, K.; OCHIAI, M.; YAMAMOTO, T.; HIRANO, F.; IMAMURA, S.; NAGAI, H.; OHISHI, K.; HORIUCHI, N.; KIJIMA, M. Prevalence of Met-203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan. **Biologicals**, v. 42, n. 2, p. 109-113, 2014.

UCHIYAMA, M.; SHIMAZAKI, Y.; ISSHIKI, Y.; KOJIMA, A.; HIRANO, F.; YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; NAGAI, H. Pathogenic characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Met-203 type SpaA strains from chronic and subacute swine erysipelas in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 79, n. 1, p. 18-21, 2017.

USDA. **Foreign Agricultural Service. United States Department of Agriculture**, 2022.

VERBARG, S.; RHEIMS, H.; EMUS, S.; FRUHLING, A.; KROPPESTEDT, R. M.; STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of *Erysipelotrichaceae* fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 1, p. 221-225, 2004.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Front Immunol**, v. 5, n., p. 520, 2014.

WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 405-417, 2010.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: Leman, A. D., Straw, B.E., Mengeling, e W.L., D. A., S., Taylor, D.J. (Ed.). **Diseases of Swine**. Iowa State Univ. Press, Ames, IA, 1999. v.8, p.475–486.

WUCHERPFENNIG, K. W. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. **J Clin Invest**, v. 108, n. 8, p. 1097-1104, 2001.

YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; YOSHIMURA, H.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 48, n. 2, p. 115-126, 2001.

YANG, F.; GU, J.; YANG, L.; GAO, C.; JING, H.; WANG, Y.; ZENG, H.; ZOU, Q.; LV, F.; ZHANG, J. Protective Efficacy of the Trivalent *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine Candidate PcrV-OprI-Hcp1 in Murine Pneumonia and Burn Models. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3957, 2017.

YOKOMIZO, Y.; ISAYAMA, Y. Antibody activities of IgM and IgG fractions from rabbit anti-Erysipelothrix rhusiopathiae sera. **Res Vet Sci**, v. 13, n. 3, p. 294-296, 1972.

ZHU, W.; CAI, C.; WANG, Y.; LI, J.; WU, C.; KANG, C.; SUN, X.; JIN, M. Characterization of roles of SpaA in Erysipelothrix rhusiopathiae adhesion to porcine endothelial cells. **Microb Pathog**, v. 113, n., p. 176-180, 2017.

ZHU, W.; WU, C.; KANG, C.; CAI, C.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Q.; SUN, X.; JIN, M. Evaluation of the protective efficacy of four newly identified surface proteins of Erysipelothrix rhusiopathiae. **Vaccine**, v. 36, n. 52, p. 8079-8083, 2018.

ZOU, Y.; ZHU, X.; MUHAMMAD, H. M.; JIANG, P.; LI, Y. Characterization of Erysipelothrix rhusiopathiae strains isolated from acute swine erysipelas outbreaks in Eastern China. **J Vet Med Sci**, v. 77, n. 6, p. 653-660, 2015.