

**Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis***  
*Chemically defined synthetic medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture.*

MOURA-COSTA L. F. \*, PAULE B. J. A. §, AZEVEDO, V.; FREIRE S. M., NASCIMENTO I., SCHAEER R., REGIS L. F., VALE V. L. C., MATOS D. P., BAHIA R. C., CARMINATI R., MEYER R.

\* Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Bahia, Departamento de Biointeração, Setor de Microbiologia, lilia@ufba.br, § Setor de Imunologia e Biologia Molecular, bpaule@ufba.br.

**RESUMO:** Um meio quimicamente definido para *Corynebacterium pseudotuberculosis* é descrito. Foram testadas, simultaneamente, a influência de concentrações crescentes de misturas de aminoácidos essenciais, não essenciais e vitaminas, assim como a proporção de sais mono e dibásicos do tampão fosfato, sobre o crescimento de três cepas. Foi observado que o aumento da concentração de vitaminas levou a um maior crescimento, enquanto que o aumento da concentração de aminoácidos não se traduziu em aumento da população bacteriana. Quanto aos tampões utilizados, foi demonstrado que naqueles onde havia maior concentração de sais dibásicos ocorreu um maior desenvolvimento das culturas. O meio de cultura descrito permitiu o crescimento da bactéria e a secreção de proteínas livres de macromoléculas heterólogas, abrindo novas perspectivas para o estudo imunológico de *C. pseudotuberculosis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, meio sintético, proteínas.

**SUMMARY:** A chemically defined medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* is described. We have tested simultaneously the influence of increasing concentrations of mixtures of essential, not essential amino acids and vitamins, as well as the ratio of phosphate buffer mono and dibasic salts, on the growth of three strains. It was observed that the increase of the vitamins concentration led to a better growth, while the increase of the amino acid concentration didn't increase the bacterial growth. It was demonstrated that the buffer with greater concentration of dibasic salts caused a higher development of the cultures. The culture medium described allowed the growth of the bacterium, and the production of secreted proteins, in macromolecules free conditions, opening new perspectives for immunologic studies of *C. pseudotuberculosis*.

**KEYWORDS:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, synthetic medium, proteins.

**Rev. Bras. Saúde Prod. An. 3 (1):1-9, 2002.**

Publicação Online da EMV/UFBA – <http://www.rbspa.ufba.br>

## INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, da dermatite ulcerativa em bovinos e da linfangite ulcerativa em eqüinos. Especificamente no Nordeste brasileiro, a sua prevalência nos rebanhos caprinos é preocupante por prejudicar uma das principais fontes de renda dos pequenos criadores da região, levando à desvalorização da pele, diminuição da produção de leite e aumento de custos com o tratamento das lesões (ALVES & OLANDER 1999).

Os meios de cultura atualmente usados para o cultivo e a obtenção de antígenos de *C. pseudotuberculosis* são ricos em proteínas, como os meios BHI (infusão de coração e cérebro) e Triptose (CAMERON et al., 1969;

BATEY, 1986). O desenvolvimento de um meio sintético que permita o crescimento de *C. pseudotuberculosis*, livre da presença de proteínas exógenas, possibilitaria o estudo das proteínas secretadas pela bactéria que são reconhecidas em respostas de tipo humoral e celular (ELLIS et al., 1991 a e b, BRAITHWAITE et al., 1993; MUCKLE et al., 1992). Trabalhos recentes com *Mycobacterium tuberculosis* mostraram que os antígenos secretados precocemente, em meio de cultura quimicamente definido, são potenciais candidatos a uma vacina de subunidades (ANDERSEN et al., 1991, HORWITZ et al., 1995, LINDBLAD et al., 1997). Confirmando estes resultados, KAUFMANN & HESS (1999) mostraram que antígenos secretados seriam mais eficazes que os antígenos somáticos para

compor uma vacina contra bactérias intracelulares. Além do mais, o estudo destas proteínas purificadas, antigênicas ou não, permitirá uma melhor compreensão da patogenia do microrganismo, fornecerá material livre de outras proteínas para ensaios sorológicos, ou para estudos envolvendo vacinação em animais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Microrganismos

Neste estudo foram usadas três cepas bacterianas isoladas no interior do Estado da Bahia e mantidas na coleção do Setor de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, e codificadas como: T1, T2 e 1002. A cepa 1002, isolada em 1971, é a cepa usada em uma vacina viva atenuada contra linfadenite caseosa (RIBEIRO et al, 1991). As três cepas foram identificadas como *Corynebacterium pseudotuberculosis* pelo sistema API Coryne (Biomérieux, França).

### Meios de cultura

Foram desenvolvidos 27 meios combinando três fatores:

- A proporção dos sais mono e dibásicos responsáveis pela molaridade do tampão fosfato, sendo testados três níveis: proporção dibásico-monobásico de 94%, 72% e 50% (Tabela 1);

O propósito deste trabalho foi otimizar a composição de um meio de cultura quimicamente definido para o crescimento de *C. pseudotuberculosis*, capaz de permitir uma melhor caracterização das funções biológicas e imunológicas das proteínas secretadas.

- A concentração final de complexos de aminoácidos essenciais e não essenciais (MEM Amino Acids Solution e MEM Non Essential Amino Acids Solution, Life Technologies, USA), sendo testados três níveis: 1%, 2% e 4% (Tabela 2).

- A concentração final de um complexo multivitamínico (MEM Vitamin Solution, Life Technologies, USA), sendo testados três níveis: 1%, 2% e 4% (Tabela 3);

Os tampões foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A solução de glicose foi filtrada em membrana de nitrocelulose de porosidade de 0,22 µm. As soluções de vitaminas e de aminoácidos essenciais e não essenciais foram adicionados asépticamente aos tampões já esterilizados.

O delineamento experimental está apresentado na tabela 4.

**Tabela 1: Composição em g/L dos 3 tampões testados**

|  | Tampão Fosfato: 0,067 M                 |   |   |
|--|---|---|---|
|  | F 1                                     | F 2                                     | F 3                                     |
|  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>94% | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>72% | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>50% |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) | 16,88 g                                 | 12,93 g                                 | 8,98 g                                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)             | 0,55 g                                  | 2,55 g                                  | 4,56 g                                  |
| NH <sub>4</sub> Cl                                   | 1,00 g                                  | 1,00 g                                  | 1,00 g                                  |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 0,02 g                                  | 0,02 g                                  | 0,02 g                                  |
| MgSO <sub>4</sub>                                    | 0,20 g                                  | 0,20 g                                  | 0,20 g                                  |
| Glicose  | 12,00 g                                 | 12,00 g                                 | 12,00 g                                 |
| Tween 80   | 1,00 g                                  | 1,00 g                                  | 1,00 g                                  |

### Semeadura e condições de cultivo

As três cepas foram repicadas cinco vezes em caldo BHI, em intervalos de 48h, até se obter um crescimento satisfatório. As massas bacterianas obtidas no último repique em 5 mL de caldo BHI foram lavadas duas vezes em PBS e pesadas. A quantidade de massa bacteriana utilizada para semeadura foi igualada entre as cepas, respeitando um mesmo peso de massa úmida por volume de ressuspensão (23 mg/mL) e um mesmo volume de solução de semeadura por volume de meio semeado (20 µL por mL de meio).

Cada cepa foi cultivada nos 27 meios de cultura em tubos de 5 mL. As culturas foram incubadas a 37°C em aerobiose durante três dias e o crescimento acompanhado a cada 24h de incubação. A viabilidade e a pureza de cada cultura após 72 h de crescimento foram

avaliadas por coloração de Gram e semeadura em agar BHI.

### Crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi medido através da densidade ótica (DO 630) nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Para cada tempo de cultura, foi calculada a  $\Delta$  DO correspondendo à diferença entre a DO no tempo definido e a DO no tempo 0 h.

Foi feita uma curva padrão relacionando densidade ótica e a contagem de células viáveis, com o objetivo de evidenciar se havia uma correspondência entre o aumento da DO 630 e o aumento do número de células viáveis. A contagem de células viáveis foi feita através de semeadura por disseminação de 100 µl de cada diluição em placas de Petri com agar BHI, usando-se alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48h.

Tabela 2: Composição (g/L) de aminoácidos dos meios testados.

|                    | AA1%   | AA2%   | AA4%   |
|--------------------|--------|--------|--------|
|                    | g/L    | g/L    | g/L    |
| <b>Aminoácidos</b> |        |        |        |
| Arginina           | 0,0632 | 0,1264 | 0,2528 |
| Cistina            | 0,0120 | 0,0240 | 0,0480 |
| Histidina          | 0,0210 | 0,0420 | 0,0840 |
| Isoleucina         | 0,0263 | 0,0525 | 0,1050 |
| Leucina            | 0,0262 | 0,0524 | 0,1048 |
| Lisina             | 0,0363 | 0,0725 | 0,1450 |
| Metionina          | 0,0076 | 0,0151 | 0,0302 |
| Fenilalanina       | 0,0165 | 0,0330 | 0,0660 |
| Treonina           | 0,0238 | 0,0476 | 0,0952 |
| Triptófano         | 0,0051 | 0,0102 | 0,0204 |
| Tirosina           | 0,0180 | 0,0360 | 0,0720 |
| Valina             | 0,0234 | 0,0468 | 0,0936 |
| Alanina            | 0,0089 | 0,0178 | 0,0356 |
| Asparagina         | 0,0132 | 0,0264 | 0,0528 |
| Ácido Aspártico    | 0,0133 | 0,0266 | 0,0532 |
| Ácido Glutâmico    | 0,0133 | 0,0266 | 0,0532 |
| Glicina            | 0,0075 | 0,0150 | 0,0300 |
| Serina             | 0,0105 | 0,0210 | 0,0420 |

### Medição do pH

O pH foi medido nos 27 meios nos tempos 0, 20h, 24h, 40h, 48h, e 72h de crescimento.

### Eletroforese do sobrenadante das culturas

Após 72 h de cultivo a 37 °C, as culturas obtidas nos nove meios à base do tampão F1, foram reunidas em um *pool* para cada uma das três cepas testadas. Assim, foram misturadas as

culturas obtidas nos meios 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 (tabela 4) de cada cepa, obtendo-se ao final três *pools* de culturas. O tampão F1 foi escolhido por ter proporcionado para as três cepas testadas um bom crescimento. A massa bacteriana de cada *pool* foi eliminada por centrifugação (3.000 g, 10 min.) e filtração do sobrenadante (Membrane Millipore, 0,22 µm). Os sobrenadantes foram concentrados 40 vezes

por ultrafiltração (Membrana Millipore, 10kDa), ressuspensos em PBS e estocados a -20°C até a sua utilização. O teor de proteínas dos sobrenadantes concentrados foi dosado pelo kit Bio-Rad DC Protein Assay (LOWRY et al., 1951). Foi realizada eletroforese unidimensional com gel de empilhamento a 4% de poliacrilamida e o gel de migração a 12% de poliacrilamida. Foram adicionados o equivalente a 50µg de proteína por poço de 0,8 cm de largura. Como padrão de peso molecular

foram usadas fosforilase B (94kDa), albumina sérica bovina (67kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e α-lactalbumina (14,4kDa). Os pesos moleculares das proteínas encontradas foram calculados usando-se o RF (distância em centímetros de migração da proteína a partir do gel de corrida/ distância da migração do corante azul de bromofenol a partir do gel de corrida). Após da corrida, o gel foi corado com Coomassie blue.

**Tabela 3: Composição (g/L) de vitaminas dos meios testados.**

|                   | Vit.1%<br>g/L | Vit. 2%<br>g/L | Vit.4%<br>g/L |
|-------------------|---------------|----------------|---------------|
| <b>Vitaminas</b>  |               |                |               |
| Pantotenato de Ca | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |
| Cloreto de Colina | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |
| Ácido Fólico      | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |
| Inositol          | 0,0020        | 0,0040         | 0,0080        |
| Niacinamida       | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |
| Piridoxal         | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |
| Riboflavina       | 0,0001        | 0,0002         | 0,0004        |
| Tiamina HCl       | 0,0010        | 0,0020         | 0,0040        |

**Tabela 4: Delineamento experimental e codificação dos meios testados:**

|                  | Aminoácidos (1%) |        |        | Aminoácidos (2%) |         |         | Aminoácidos (4%) |         |         |
|------------------|------------------|--------|--------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
|                  | AA1%             |        |        | AA2%             |         |         | AA4%             |         |         |
|                  | Vit 1%           | Vit 2% | Vit 4% | Vit 1%           | Vit 2%  | Vit 4%  | Vit 1%           | Vit 2%  | Vit 4%  |
| Cepa T1          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Tampão F1<br>94% | Meio 1           | Meio 4 | Meio 7 | Meio 10          | Meio 13 | Meio 16 | Meio 19          | Meio 22 | Meio 25 |
| Cepa T2          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Cepa 1002        |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Cepa T1          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Tampão F2<br>72% | Meio 2           | Meio 5 | Meio 8 | Meio 11          | Meio 14 | Meio 17 | Meio 20          | Meio 23 | Meio 26 |
| Cepa T2          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Cepa 1002        |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Cepa T1          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Tampão F3<br>50% | Meio 3           | Meio 6 | Meio 9 | Meio 12          | Meio 15 | Meio 18 | Meio 21          | Meio 24 | Meio 27 |
| Cepa T2          |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |
| Cepa 1002        |                  |        |        |                  |         |         |                  |         |         |

#### **Análise estatística:**

Os resultados de crescimento ( $\Delta$  DO) foram comparados através de análise de variância num dispositivo fatorial com três fatores em bloco,

cada cepa constituindo um bloco. A comparação das médias foi feita pelo Teste de Newman-Keuls ao nível de significação de 5%.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um meio quimicamente definido é proposto a partir dos resultados obtidos com o crescimento de três cepas de *C. pseudotuberculosis*, testando simultaneamente a influência de concentrações crescentes de misturas de aminoácidos essenciais, não essenciais e vitaminas, assim como a

proporção de sais mono e dibásicos do tampão fosfato. O meio definido tem uma composição química facilmente reproduzível, sem excesso de nutrientes e sem proteínas que possam interferir no estudo das proteínas bacterianas.

Em função do grau de homologia filogenética existente entre os gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (PASCUAL et al., 1995), foram feitos estudos iniciais visando o crescimento de *C. pseudotuberculosis*, utilizando formulações derivadas do meio de Sauton, porém sem sucesso. A elaboração do meio tratado neste estudo baseou-se nas concentrações de sais de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4$  utilizadas no meio mínimo M-9 usado por PRIYOLKAR et al. (1989) para um estudo com *C. murisepticum*. A escolha da molaridade do tampão fosfato (0,067 M), as concentrações em glicose (12 g/L) e Tween 80 (0,1%), basearam-se em resultados do trabalho de BATEY (1986) com *C. pseudotuberculosis* em meio líquido complexo.

O delineamento experimental escolhido, assim como a definição do inóculo garantiram uma massa bacteriana inicial idêntica para cada cepa nos 27 meios testados, permitindo uma comparação entre meios. Os resultados da análise estatística do crescimento bacteriano nos três meios estão apresentados na tabela 5. Constatou-se que houve diferenças significativas entre crescimento das três cepas ( $P < 0,05$ ), tendo a cepa T1 obtido um maior crescimento, quando comparada às cepas T2 e 1002. Apesar de a análise estatística não ter constatado interações entre o crescimento das cepas (blocos) e os meios testados (tratamentos), a cepa 1002 apresenta um comportamento ligeiramente diferenciado, com tendência a crescer melhor em tampões menos alcalinos (Figura 1 C e F). Os resultados correlacionando DO 630 nm e a contagem de colônias em placa para a cepa T1 mostraram uma boa correlação ( $r = 0,87$ , dados não mostrados) entre estes dois parâmetros.

Os dados da tabela 5 mostram que houve um melhor crescimento nos tampões com proporção maior de sais dibásicos, e, portanto mais alcalinos. Observou-se um efeito negativo da concentração de aminoácidos após 48 horas de cultura, porém estatisticamente não significativo, e que se tornou significativo após 72 horas de crescimento (tabela 5). Mesmo não tendo havido interação entre tipo de tampão e concentração de aminoácidos, o efeito negativo foi mais nítido no tampão F3 (50% de sais dibásicos) em relação aos tampões F2 e F1 (Figura 1 A, B e C).

A ausência de associação (tempo 24h e 48 h) ou a associação negativa (tempo 72 h), observadas neste experimento, entre concentração em aminoácidos e crescimento bacteriano, foi descrito por FOUCAUD et al. (1997). Constatou-se que, mesmo estando com valores próximos aos indicados pelo fabricante (2% para os aminoácidos essenciais e 1% para os não essenciais), a concentração final da maioria dos aminoácidos ficou, de 2 a 10 vezes abaixo dos valores referidos na literatura sobre meios quimicamente definidos (REDDY et al., 1980; FERGUSON & CUMMINS, 1978; FOUCAUD et al., 1997; WELSHIMER, 1963; COCAIGN-BOUSQUET et al., 1995). Portanto, não deve ter havido influência destas baixas concentrações sobre o crescimento bacteriano. A adição crescente das soluções ácidas de aminoácidos ( $\text{pH}=1$ ) levou a uma diminuição do pH inicial dos meios (Figura 2), que pode ter influenciado negativamente o crescimento bacteriano. O aporte de nitrogênio pode ter sido parcialmente suprido pela presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , conforme descrito para *Corynebacterium renale* (VAN ESELTINE et al., 1978).

Observou-se uma relação positiva ( $P < 0,10$ ) entre concentrações crescentes em vitaminas e aumento do crescimento bacteriano (Figura 1 D, E e F). As menores concentrações de vitaminas usadas neste experimento (1%) apresentaram, com a exceção da riboflavina, teores compatíveis com meios quimicamente definidos otimizados para outras espécies de bactérias a exemplo de *Corynebacterium pyogenes* (REDDY et al., 1980), *Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *P. granulorum* (FERGUSON & CUMMINS, 1978), *Leuconostoc mesenteroides* (FOUCAUD et al., 1997), *Listeria monocytogenes* (WELSHIMER, 1963) e *Lactococcus lactis* (COCAIGN-BOUSQUET et al., 1995). Os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir que as observações feitas por estes pesquisadores quanto às concentrações de vitaminas, estariam no limite mínimo das necessidades bacterianas, e poderiam vir a ser aumentadas em pelo menos quatro vezes, melhorando desta forma, o rendimento das culturas.

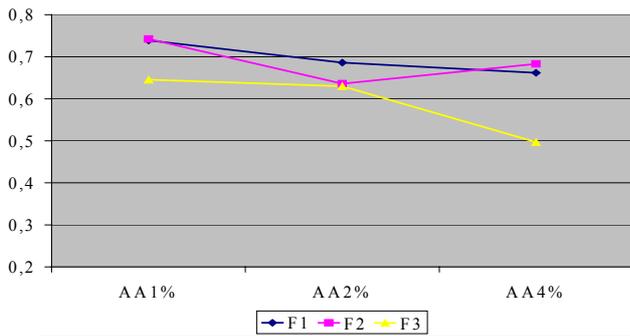


Figura 1 A: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa T1 em função do teor de aminoácidos e do tipo de tampão.

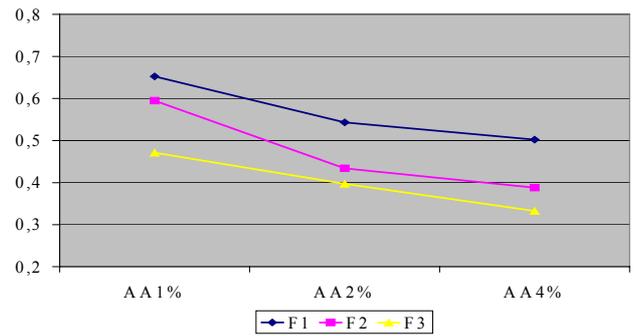


Figura 1 B: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa T2 em função do teor de aminoácidos e do tipo de tampão.

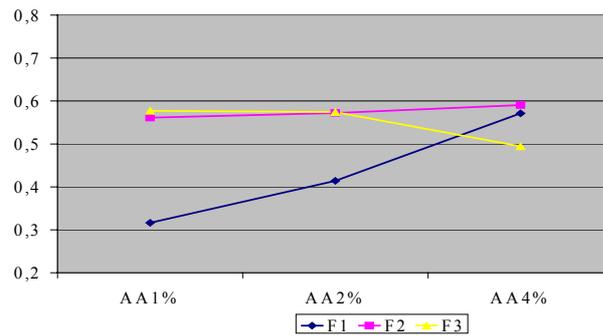


Figura 1 C: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa 1002 em função do teor de aminoácidos e do tipo de tampão.

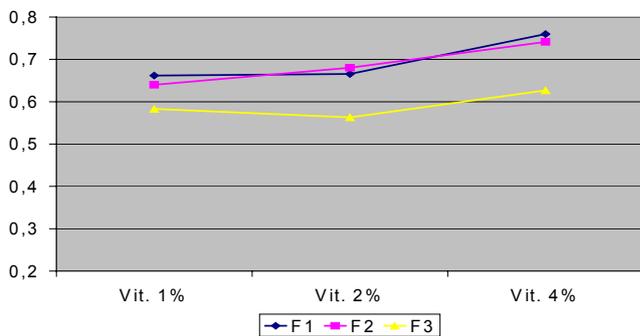


Figura 1 D: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa T1 em função do teor de vitaminas e do tipo de tampão.

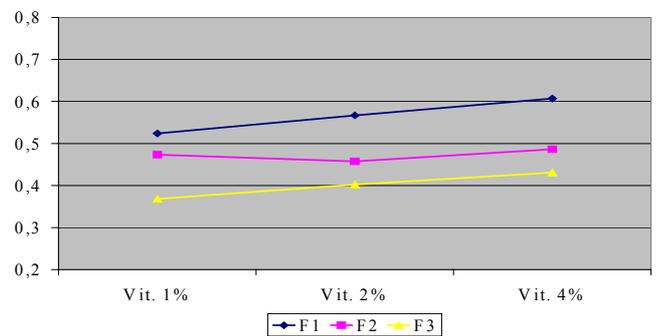


Figura 1 E: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa T2 em função do teor de vitaminas e do tipo de tampão.

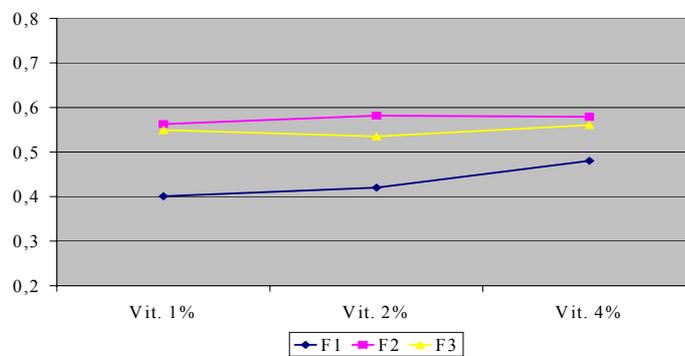


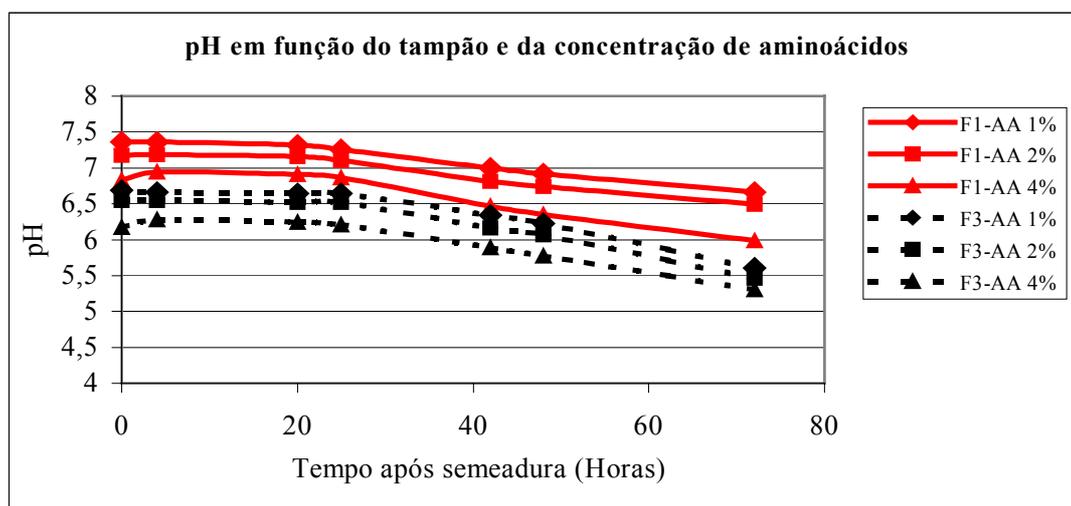
Figura 1 F: Soma das DO 24, 48 e 72 horas da cepa 1002 em função do teor de vitaminas e do tipo de tampão.

**Tabela 5: Médias das variáveis  $\Delta DO_{630nm}$  ( $DO T x - DO T 0$ ) e Soma das  $\Delta DO$ .**

| FATORES      |       | VARIÁVEIS           |                    |                    |                      |
|--------------|-------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|              |       | $\Delta DO$ 24 H    | $\Delta DO$ 48 H   | $\Delta DO$ 72 H   | Soma das $\Delta DO$ |
| Tampão       | F1    | 0,123 <sup>A*</sup> | 0,229 <sup>A</sup> | 0,215 <sup>a</sup> | 0,566 <sup>A</sup>   |
|              | F2    | 0,111 <sup>A</sup>  | 0,233 <sup>A</sup> | 0,234 <sup>b</sup> | 0,578 <sup>A</sup>   |
|              | F3    | 0,097 <sup>B</sup>  | 0,204 <sup>B</sup> | 0,212 <sup>a</sup> | 0,513 <sup>B</sup>   |
| Amino ácidos | 1%    | 0,115               | 0,231              | 0,243 <sup>A</sup> | 0,590 <sup>A</sup>   |
|              | 2%    | 0,106               | 0,222              | 0,215 <sup>B</sup> | 0,543 <sup>AB</sup>  |
|              | 4%    | 0,109               | 0,213              | 0,203 <sup>B</sup> | 0,524 <sup>B</sup>   |
| Vitaminas    | 1%    | 0,104 <sup>b</sup>  | 0,216              | 0,209 <sup>a</sup> | 0,529 <sup>a</sup>   |
|              | 2%    | 0,108 <sup>a</sup>  | 0,217              | 0,218 <sup>a</sup> | 0,543 <sup>a</sup>   |
|              | 4%    | 0,118 <sup>a</sup>  | 0,234              | 0,234 <sup>b</sup> | 0,586 <sup>b</sup>   |
| Interações   | Todas | NS**                | NS                 | NS                 | NS                   |
| Blocos       | T1    | 0,114 <sup>B</sup>  | 0,289 <sup>A</sup> | 0,257 <sup>A</sup> | 0,659 <sup>A</sup>   |
|              | T2    | 0,094 <sup>B</sup>  | 0,182 <sup>B</sup> | 0,204 <sup>B</sup> | 0,480 <sup>B</sup>   |
|              | 1002  | 0,123 <sup>A</sup>  | 0,196 <sup>B</sup> | 0,200 <sup>B</sup> | 0,519 <sup>B</sup>   |

\*: Para uma mesma variável e um mesmo fator, valores acompanhados de letras diferentes diferem estatisticamente (Letras maiúsculas:  $P < 0,05$ ; letras minúsculas  $P < 0,10$ ).

\*\* : Diferenças não significativas.



**Figura 2: Evolução do pH dos meios de cultura no tempo em função do tipo de tampão e concentração de misturas de aminoácidos**

Os resultados mostrados na figura 2 confirmam a importância de adequar o sistema tampão com o nível de substrato fermentável disponível, para impedir a inibição de crescimento decorrente da acidificação obrigatória do meio. Assim como foi obtido por BATEY (1986), no nosso estudo os crescimentos registrados foram correlacionados positivamente com os valores iniciais de pH, ou seja, com a proporção maior de sais dibásicos. Confirmando os achados deste pesquisador, valores finais de pH em torno de 5 a 5,5 mostraram-se inibitórios.

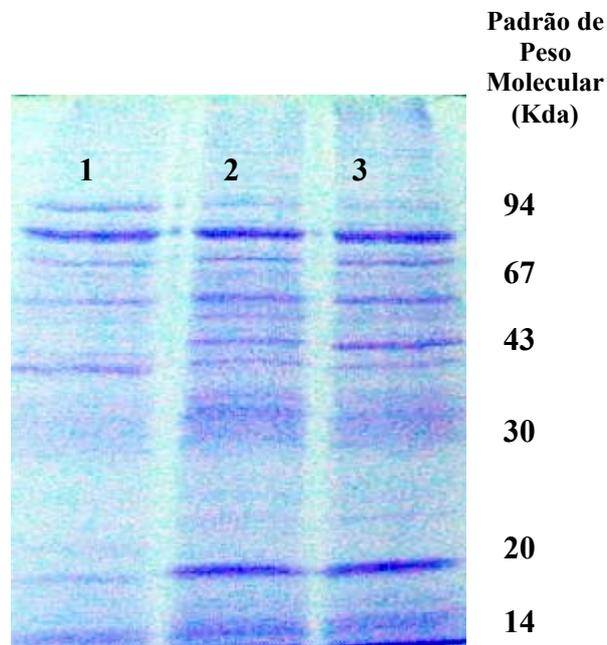
Os padrões de proteínas secretadas observados por SDS-PAGE das cepas T1, T2 e 1002 quando cultivadas no meio quimicamente definido estão mostrados na figura 3.

Dos 27 meios estudados, o que apresentou melhor resultado de crescimento para as cepas testadas, foi o meio composto de 72% de fosfato dibásico, 4% de vitaminas e 1% de aminoácidos. Este meio foi usado para a produção de complexo antigênico secretado por *C. pseudotuberculosis*, que se mostrou capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células do sangue periférico de caprinos com sinais

clínicos da linfadenite caseosa (REGIS, 2001). O mesmo complexo antigênico foi usado para a padronização de um teste de ELISA indireto para diagnóstico de linfadenite caseosa em

caprinos, cujas sensibilidade e especificidade foram de, respectivamente, 96,8% e 98,2% (MOURA COSTA, 2002).

**Figura 3:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (12%) das frações secretadas das cepas 1002 (1), T2 (2) e T1 (3) coradas por Coomassie blue.



Um meio de cultura quimicamente definido, livre de macromoléculas na sua composição, permite a obtenção de complexos antigênicos compostos apenas de proteínas da bactéria e abre novas perspectivas para o estudo das proteínas secretadas. Pesquisando isoladamente ou em grupos, por pesos moleculares, as proteínas secretadas, será possível analisar a importância de cada uma delas em diferentes estágios da doença e conseqüentemente compreender melhor a interação parasito-hospedeiro. Estudos nesta linha viabilizarão a proposição de testes que permitam diagnósticos

mais precisos, além de possibilitarem pesquisas sobre a importância imunogênica de cada uma das frações isoladas e o potencial uso destas frações em vacinas mais eficazes contra linfadenite caseosa.

#### **AGRADECIMENTOS:**

*Agradecemos à Profa. Dra. Sílvia Sardi e ao Dr. Gúbio Soares Campos, do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, por ter-nos cedido a aparelhagem dos seus laboratórios para a realização deste trabalho.*

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Andersen P; Askgaard D; Ljungqvist L; Bentzon M W; Heron I. T-cell Proliferative Response to Antigens Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991;59:1558-63.  
Alves FSF; Olander H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. *Veterinária Notícia, Uberlândia* 1999; 5:69-75.

Batey RG. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a Liquid Medium. *Vet Microbiol* 1986;11:145-152.  
Braithwaite CE; Smith EE; Songer JG; Reine AH. Characterization of Detergent-Soluble Proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Microbiol* 1993;38: 59-70.

- Cameron CM; Minnar JL; Purdom MR. Immunizing properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cell Walls. Onderstepoort J Vet Res 1969;36 : 211-216.
- Cocaign-Bousquet M; Garrigues C; Novak L; Lindley ND; Loubiere P. Rational development of a Simple Synthetic Medium for the Sustained Growth of *Lactococcus lactis*. J Applied Microbiol 1995 ; 79:108-116.
- Ellis JÁ; Hawk DA; Mills K; Pratt DL. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with Caseous Lymphadenitis. Vet Immun and Immunopathol 1991a ; 28:289-301.
- Ellis JÁ; Hawk DA; Mills K; Pratt DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Vet Immun and Immunopathol 1991b ; 28:303-316.
- Ferguson Jr. DA; Cummins CS. Nutritional requirements of anaerobic Coryneforms. J Bacteriol 1978;35(3):858-867.
- Foucaud C; François A; Richard J. Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. Applied Environmental Microbiol 1997;63(1): 301-304.
- Horwitz MA; Lee BW; Dillon BJ; Harth G. Protective Immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extra cellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:1530-1534.
- Kaufmann SHE; Hess J. Impact of intracellular of and antigen display by intracellular bacteria: implication for vaccine development. Immunology Letters 1999;65:81-84.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the Head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970 ; 227 : 680-685.
- Lindblad EB; Elhay; MJ; Silva R; Appelberg Andersen P. Adjuvant modulation of immune response to tuberculosis sub-unit vaccines. Infect Immun 1997;65: 623-629.
- Lowry OH; Rosebrogh NN; Farr AL; Randall RJ. Protein measurement with the follin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193:265-275.
- Moura Costa LF. Desenvolvimento de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2002.
- Muckle CA; Menzies PILI; Hwang YT; Van Wesenbeeck M. Analysis of immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Microbiol 1992;30: 47-58.
- Pascual CD; Lawson PA; Farrow JÁ; Gimenez MN; Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* Based on 16S rRNA Gene Sequences. Int. J Syst. Bacteriol 1995;45:724-728.
- Priyolkar M; Nair CKK; Pradhan DS. Purification and characterization of an  $\beta$ -galactosidase from *Corynebacterium muricepticum*. Arch Microbiol 1989;151:49-53.
- Reddy CA; Cornell CP; Fraga AM. Chemically defined growth medium for *Corynebacterium pyogenes*. Am J Vet Res 1980 ; 41(5):843-845.
- Regis L. Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis* [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2001.
- Van Eseltine WP; Cox WM; Kadis S. Minimal nitrogen requirements of *Corynebacterium renale* strains. Am J Vet Res 1978;39(1):123-128.
- Welshimer HJ. Vitamins requirements of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol 1963;85:1156-11.