

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade
contra clostridioses

Carlos Eduardo Pouey da Cunha

Pelotas, 2012

Carlos Eduardo Pouey da Cunha

Desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade contra clostridioses

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Dr. Marcelo Mendonça

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

972d

Cunha, Carlos Eduardo Pouey da

Desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade contra clostridioses / Carlos Eduardo Pouey da Cunha. – 88f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Fabricio Rochedo Conceição ; co-orientador Marcelo Mendonça.

1.Biotecnologia. 2. Botulismo. 3. Vacinas recombinantes. 4. Diarreia neonatal. 5. Bovinos. 6. Suínos. 7. Clostridium. I. Conceição, Fabricio Rochedo. II. Mendonça, Marcelo. III. Título.

CDD: 636.0896

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (orientador), Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família e amigos. Sem eles, não teria chegado até aqui”.

Agradecimentos

Aos pais, Maria Tereza e Carlos, irmãs, Paula e Mariana, e demais familiares pelo apoio incondicional e proporcionar que este momento se tornasse realidade.

Ao Prof. Fabrício e ao Marcelo e demais professores pelas oportunidades, orientações e ensinamentos.

Aos colaboradores da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela parceria em projetos possibilitando o desenvolvimento dos trabalhos aqui apresentados.

Aos amigos e colegas dos laboratórios de Imunologia Aplicada e Bacteriologia pelos do Centro e Desenvolvimento Tecnológico pelos momentos de diversão, amizade e que possibilitaram meu desenvolvimento, tanto profissional quanto pessoal, bem como por tornar o laboratório um local agradável de trabalho.

Aos demais amigos e colegas pela amizade e pelos momentos de descontração e apoio que ajudaram a tornar essa jornada menos árdua.

Ao CNPq por concessão de bolsa de iniciação científica, servindo como incentivo a continuar essa caminhada.

Resumo

CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da. **Desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade contra clostridioses**. 2012. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O estágio supervisionado foi realizado durante o segundo semestre de 2012 no laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas. O presente conta com uma revisão bibliográfica (Capítulo 2) acerca de clostridioses causadas por *Clostridium botulinum* e por *C. perfringens*, bem como com o desenvolvimento de estratégias de imunização de animais para prevenção das mesmas. Tais enfermidades figuram entre as maiores causas de morte de bovinos e suínos no Brasil, apresentando índices de letalidade de 50 a 100%, variando de acordo com a doença causada, acarretando em grandes perdas econômicas aos pecuaristas. Os resultados obtidos neste período, em parceria com o LANAGRO/MG e a Escola de Veterinária da UFMG, possibilitaram escrever tanto um artigo científico (Anexo A), como um resumo expandido (Anexo B). O primeiro versa sobre a avaliação da imunogenicidade de uma quimera recombinante para controle do botulismo bovino tipos C e D, onde cobaios foram vacinados experimentalmente e produziram anticorpos neutralizantes com títulos iguais ou superiores a 5 e 10 UI/mL, respectivamente, atendendo os requisitos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 5 e 2 UI/mL, respectivamente. O segundo descreve a imunização ativa de porcas prenhas contra as toxinas alfa e beta de *C. perfringens* através da vacinação com toxoides recombinantes, bem como a imunização passiva por colostragem de suas leitegadas (Anexo B). Além disso, foi feito um relatório (Capítulo 3) descrevendo as técnicas empregadas durante o período de estágio. Nesta parte, foram descritas técnicas de biologia molecular, microbiologia e imunologia empregadas para o desenvolvimento de uma bacterina recombinante e vacina recombinante de subunidade, podendo ser empregada, em teoria, tanto para controle de botulismo quanto para enfermidades causadas pelas toxinas de *C. perfringens*, dependendo do gene clonado. Nessa etapa, foi possível a expressão e purificação de uma toxina recombinante de *Clostridium*, a qual foi liofilizada, após sua caracterização parcial, e armazenada até ser avaliada como imunógeno para animais de produção.

Palavras-chave: botulismo; vacinas recombinantes; diarreia neonatal; bovinos; suínos; *Clostridium*

Abstract

CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da. **Development of recombinant subunit vaccines against clostridiosis**. 2012. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The supervised internship took place during the second semester of 2012 in the Applied Immunology Lab of the Technological Development Center of the Federal University of Pelotas. This work consists of a bibliographical review (Capítulo 2) of clostridiosis caused by *Clostridium botulinum* and *C. perfringens*, as well as the development of animal immunization strategies against such diseases, which are amongst the main cause of death for cattle and swine in Brazil, presenting mortality rates from 50% to 100%, varying according to the disease, causing major economical losses. The results obtained during this period, in partnership with LANAGRO/MG and Veterinary School of Federal University of Minas Gerais, made it possible to write a scientific article (Attachment A) and an expanded abstract (Attachment B). The former regards the immunogenicity evaluation of a recombinant chimera against cattle botulism types C and D, where Guinea pigs were experimentally immunized and produced up to 5 and 10 IU/mL of neutralizing antibodies, respectively, meeting the requirements established by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, which are 5 and 2IU/mL, respectively. The latter describes the active immunization of pregnant sows using the recombinant alpha and beta toxins from *C. perfringens*, as well as the passive immunization of their piglets' passive immunization via colostrum. In addition, a report (Capítulo 3) describing the techniques used during the referred period was written. In this section, molecular biology, microbiology and immunology techniques used to develop a recombinant bacterin were described. This bacterin and the recombinant subunit vaccine, in theory, can be used either for botulism control or for control of infirmities caused by *C. perfringens* toxins, depending on the cloned gene. At this step, we were able to express and purify a recombinant toxin of *Clostridium*, which was lyophilized, after being partially characterized, e stocked until evaluated as a vaccine for livestock.

Key-words: botulism; recombinant vaccines; neonatal diarrhea; cattle; swine; *Clostridium*

Lista de Figuras

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Estrutura da neurotoxina botulínica..... 20
- Figura 2 Ilustração do mecanismo de ação das BoNTs..... 21

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar digestões do gene *clos3* e do vetor PAE..... 38
- Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 0,8% para triagem dos clones recombinantes..... 40
- Figura 3 Mapa do vetor de expressão pAE/*clos3*..... 40
- Figura 4 Caracterização enzimática dos clones recombinantes..... 40
- Figura 5 Eletroforese em gel de desnaturante de poliacrilamida 12% para verificar a expressão da proteína rCLOS3..... 42
- Figura 6 *Western blot* com anticorpo anti-histidina para confirmação da expressão da rCLOS3..... 45
- Figura 7 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%..... 46
- Figura 8 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% para verificar a purificação da rCLOS3..... 48

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Divisão dos tipos de <i>C. perfringens</i> de acordo com as toxinas produzidas.....	22
----------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Exemplificação de reação de digestão com enzimas de restrição.....	37
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

APS – Persulfato de amônio

ATP – Trifosfato de adenosina

BCA – Ácido bicinconínico

BoNT – Neurotoxina botulínica

CEAA – Conselho de Ética em Experimentação Animal

CFR – Código de Regulações Federais

Concea – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT – Toxina colérica

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO₆₀₀ – Densidade óptica com comprimento de luz de 600 nanômetros

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

g – Força gravitacional

g – Grama

HC_C – Porção C-terminal da cadeia pesada da neurotoxina botulínica

HC_CC/HC_CD – Quimera recombinante composta pela porção C-terminal da cadeia pesada das neurotoxinas botulínicas tipos C e D

HC_N – Porção N-terminal da cadeia pesada da neurotoxina botulínica

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa – Quilodáton

kV – Quilovolts

L – Litro

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LB – Luria-Bertani

LTB – Subunidade B da toxina termolábel de *Escherichia coli*

M – Molar

mA – miliampere

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligrama

MG – Minas Gerais

Min – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

NLS – N-lauroyl sarcosine

nm – Nanômetro

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T – Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20

rLTB – Subunidade B recombinante da toxina termolábil de *Escherichia coli*

rLTB/HC_CC/HC_CD – Quimera recombinante composta pela LTB e a porção C-terminal da cadeia pesada das neurotoxinas botulínicas tipos C e D

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

U – Unidade

UI – Unidade(s) internacional(is)

μF - Microfaraday

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1 Introdução Geral.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Botulismo.....	18
2.2 A neurotoxina botulínica.....	19
2.3 Clostridioses causadas por <i>Clostridium perfringens</i>	21
2.4 As toxinas de <i>Clostridium perfringens</i>	22
2.5 Dificuldades enfrentadas na produção de toxoides nativos.....	25
2.6 Vacinas recombinantes contra botulismo bovino tipos C e D e <i>C. perfringens</i> tipos A e C.....	26
2.7 Referências.....	28
3 RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO.....	35
3.1 Introdução.....	35
3.2 Cultivo de <i>E. coli</i> e preparação de células eletrocompetentes.....	35

3.3 Clonagem molecular e transformação de <i>E. coli</i>	36
3.4 Expressão heteróloga da rCLOS3 em sistema procarioto e produção de bacterina recombinante.....	41
3.5 <i>Western blot</i> para caracterização da proteína recombinante.....	43
3.6 Purificação da rCLOS3.....	46
3.7 Redação de trabalhos científicos.....	48
3.8 CONCLUSÃO.....	48
3.9 REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS.....	50
ANEXO A Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against <i>Clostridium botulinum</i> neurotoxins types C and D.....	51
ANEXO B VACINAÇÃO DE PORCAS COM TOXOIDE RECOMBINANTE BIVALENTE DE <i>Clostridium perfringens</i>	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho está dividido em quatro itens englobando uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados e um relatório sobre as atividades desenvolvidas no período de estágio, bem como dois anexos representando publicações advindas de atividades desenvolvidas ou dados obtido durante o referido período.

A revisão bibliográfica versa a respeito de enfermidades causadas por *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, responsáveis por intoxicações que acarretam em prejuízos à pecuária nacional e são considerados riscos de saúde pública. Medidas preventivas como vacinação e desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade como alternativa às opções atuais também foram abordados.

A última seção deste documento descreve técnicas de microbiologia, biologia molecular e imunologia empregadas na produção de uma bacterina recombinante e de uma vacina recombinante de subunidade. Este capítulo tem por objetivo descrever as técnicas de forma didática enfatizando as mesmas e utilizando dados obtidos durante o período de estágio para ilustrar os resultados. Durante o desenvolvimento do presente, foi possível finalizar a produção e caracterização da bacterina e da proteína recombinante, restando testá-las como imunógenos veterinários.

Na primeira semana de outubro, o LANAGRO/MG nos enviou os resultados dos ensaios de soroneutralização em camundongo. Esses dados foram então analisados e, como foram satisfatórios, foram redigidos dois trabalhos científicos. O

anexo A é um artigo científico submetido, no final de dezembro, ao periódico PloS One, consistindo em externar resultados acerca da resposta imune humoral gerada pela vacinação com uma quimera recombinante para controle do botulismo bovino tipos C e D. O Anexo B, um resumo expandido publicado apresentado VI Simpósio de Microbiologia Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada realizado de 5 a 8 de novembro em Porto Alegre, demonstra a imunização passiva de leitegadas contra diarreia neonatal de suínos pela vacinação com toxoides recombinantes alfa e beta de *C. perfringens*. Ambos os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas em parceria com a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e com o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do mesmo estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA CLOSTRIDIOSES

2.1 Botulismo

O botulismo é uma doença causada por intoxicação alimentar que apresenta altos índices de letalidade (DUTRA et al., 2001). Os sorotipos C e D são os responsáveis pelos casos de botulismo em bovinos no Brasil (DUTRA et al., 2005). A intoxicação é caracterizada por paralisia flácida dos músculos esqueléticos, geralmente começando pela cabeça e podendo se estender até os membros posteriores e, eventualmente, para os músculos respiratórios (SMITH, 2009). Nesse último caso, a condição pode tornar-se fatal, sendo causa de grande preocupação entre pecuaristas, uma vez que surtos de botulismo tem sido a causa de grandes perdas econômicas no Brasil. Além disso, há grande preocupação acerca de o botulismo bovino poder atuar como fonte de intoxicação alimentar para humanos (BÖHNEL et al., 2005; COSTA et al., 2008; KARALEWITZ E BARBIERI, 2012). Assim, o botulismo não é somente a causa de grandes perdas econômicas, mas também causa de preocupação para agentes de saúde pública por todo o mundo.

Nas últimas décadas, diversos surtos de botulismo afetaram a bovinocultura brasileira, apresentando índices de letalidade superiores a 99% (DUTRA et al., 2001; COSTA et al., 2008). Em bovinos, a intoxicação se dá geralmente pela ingestão de alimento ou água contaminada pelos esporos de *C. botulinum* ou pelas toxinas pré formadas, ativas ou não (SMITH, 2009). A deficiência de fósforo também é descrita como causa para intoxicação, uma vez que para supri-la os animais cometem osteofagia, isto é, roem ossos de carcaças de animais mortos (COSTA et al., 2008).

Por ser uma bactéria anaeróbia, matéria orgânica em decomposição, bem como o trato gastrointestinal, são locais propícios para seu crescimento e conseqüentemente produção das neurotoxinas botulínicas (DUTRA et al., 2001).

2.2 A neurotoxina botulínica

As neurotoxinas botulínicas (BoNTs) são divididas em sete sorotipos (A-G) de acordo com sua antigenicidade, embora tenham ação farmacológica semelhante (SIMPSON, 04). BoNTs são sintetizadas na forma de prototoxina como uma única cadeia polipeptídica de 150 kDa (SMITH, 2009). Sua ativação pode ser feita tanto por peptidases da bactéria quanto do organismo alvo de intoxicação, clivando a BoNT em uma cadeia leve e uma cadeia pesada (SIMPSON, 2004). A cadeia leve (50 kDa) é o domínio catalítico da neurotoxina, agindo como uma metaloendopeptidase dependente de zinco. O domínio N-terminal da cadeia pesada é responsável pela liberação da cadeia leve da vesícula endocítica, ao passo que a porção C-terminal da cadeia pesada é responsável por ligar a BoNT aos neurônios (SIMPSON, 2004), e é também onde encontram-se os epitopos protetores dessas neurotoxinas (RAVICHANDRAN et al., 2007). A Figura 1 ilustra a estrutura das BoNTs. A cadeia pesada tem aproximadamente 100 kDa (50 kDa em cada domínio) e está ligada à cadeia leve por uma ponte dissulfeto (TURTON et al., 2002; KARALEWITZ E BARBIERI, 2012).

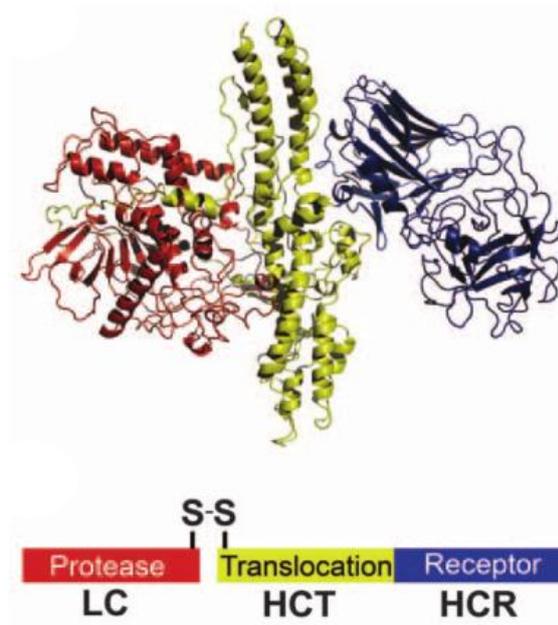


Figura 1: Estrutura da neurotoxina botulínica. Adaptado de Baldwin et al (2008).

A paralisia no botulismo é causada pelo bloqueio da liberação de acetilcolina na fenda sináptica, de modo que o músculo não recebe o sinal para se contrair (SIMPSON, 2004). A porção C-terminal da cadeia pesada liga o gangliosídeo GT1b presente na superfície de neurônios colinérgicos permitindo que a porção N-terminal da cadeia pesada transloque a cadeia leve para o citoplasma devido a mudança de pH na vesícula endocítica (TURTON et al, 2002; SIMPSON, 2004). Uma vez internalizada, a cadeia leve cliva proteínas responsáveis pela ancoragem da vesícula sináptica contendo acetilcolina à superfície interna da membrana plasmática do neurônio, de forma que o neurotransmissor não pode ser liberado na fenda sináptica (Fig 2).

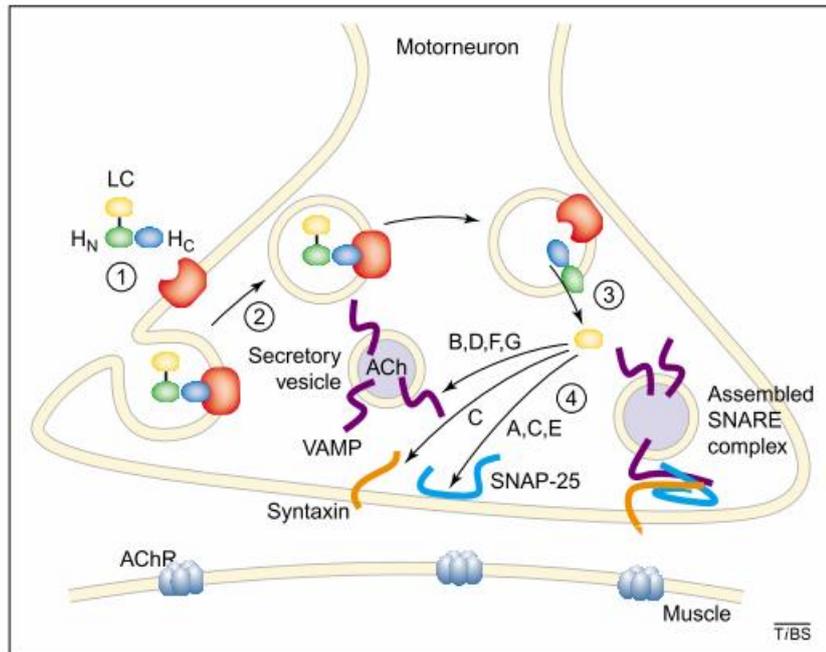


Figura 2: Ilustração do mecanismo de ação das BoNTs. Ilustração da ligação da BoNT ao gangliosídeo GT1b, internalização da mesma, liberação da cadeia leve no citoplasma do neurônio colinérgico, possibilitando a clivagem de proteínas essenciais para a liberação de acetilcolina na placa motora, de modo que a contração muscular é inviabilizada. Adaptado de Turton et al (2002).

2.3 Clostridioses causadas por *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens pode ser encontrado no solo, água, matéria orgânica em decomposição e no trato gastrointestinal de diversos animais e humanos saudáveis (GONÇALVES et al., 2009; TITBALL et al., 1999). *C. perfringens* é dividido em 5 toxinotipos (A-E) de acordo com o padrão de expressão de quatro exotoxinas: alfa, beta, épsilon e iota (UZAL e SONGER, 2008). A Tabela 1 mostra os padrões de expressão das toxinas usados para diferenciar cada tipo.

Tabela 1: Divisão dos tipos de *C. perfringens* de acordo com as toxinas produzidas. Adaptado de Uzal et al., (2010).

Tipo	CPA	CPB	ETX	ITX
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

C. perfringens é responsável por causar uma gama de doenças em diversas espécies animais, variando de acordo com as toxinas produzidas por cada tipo, com a imunidade e com a dieta do animal (UZAL & SONGER, 2008; GONÇALVES et al., 2009). As enfermidades, assim como as toxinas que as causam, são potencialmente fatais, o que vem a gerar grandes perdas econômicas (CHANDRAN et al., 2010).

As toxinas alfa, beta e épsilon são as principais responsáveis pelas doenças de maior impacto econômico, tais como enterotoxemia, enterite necrótica, gangrena gasosa, alterações no sistema nervoso central e morte súbita. Os principais animais produtores afetados são aves (galinhas, em geral), suínos, bovinos e ovinos.

2.4 As toxinas de *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens produz até 15 toxinas capazes causarem diversas intoxicações (FERNANDEZ-MIYAKAWA et al., 2007). Aqui serão abordadas as toxinas alfa e beta produzidas pelos tipos A, B e C, sendo o primeiro e o último responsáveis por causar diarreia neonatal em suínos, resultando em grandes prejuízos à suinocultura brasileira, a qual é a responsável pela renda de 2,7 milhões de pessoas (SALVARANI, 2011). Em um levantamento realizado por Yaeger (2007), *C. perfringens* foi designado como responsável por 24,6% das infecções de leitões numa propriedade com 77 animais. Infecções por *C. perfringens* tipo C, produtor das

toxinas alfa e beta, geralmente resultam em morte súbita, com curso clínico podendo durar apenas um dia (SONGER, 1996). Uma vez o rebanho infectado, as clostridioses se tornam endêmicas, com taxas de morbidade e letalidade variando de 30 a 50% e de 50 a 100%, respectivamente (SONGER., 1996).

A toxina alfa, a principal toxina letal produzida por todos os tipos de *C. perfringens*, é uma metaloenzima dependente de zinco de 370 aminoácidos composta por dois domínios. A porção C-terminal é responsável pela ligação à membrana plasmática, apresentando epitopos protetores capazes de conferir imunidade contra esta toxina (TITBALL, 1999), embora estudos demonstrem que anticorpos contra ambos domínios são necessários para conferir proteção contra hemólise (SCHOEPE et al., 1997). A porção N-terminal constitui o domínio catalítico caracterizado como uma fosfolipase C, sendo também a primeira toxina bacteriana com atividade enzimática descrita, onde sua ação em lipoproteína de gema de ovo causa turbidez (reação de Nagler), e desta forma, é utilizada como método de diagnóstico (TITBALL, 1999). A toxina alfa causa hemólise devido à sua ação de fosfolipase sobre lipídeos da membrana plasmática de eritrócitos, danificando também os vasos sanguíneos, diminuindo o aporte sanguíneo, resultando em gangrena e em um ambiente favorável à multiplicação de *C. perfringens* por formar um ambiente anaeróbio rico em nutrientes (TITBALL et al., 1999).

A toxina beta forma poros na membrana plasmática das células alvo, alterando a permeabilidade das mesmas aos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , causando desequilíbrio osmótico e consequente lise celular e necrose tecidual (UZAL et al., 2010), sendo este o principal fator letal em infecções pelo tipo C (SHATURSKY et al., 2000; UZAL e SONGER, 2008). A sensibilidade dessa toxina à tripsina pode explicar porque leitões neonatos são mais suscetíveis aos seus efeitos, uma vez que

os mesmos não produzem tripsina pancreática nesse período e também pela presença de inibidores de tripsina no colostro (SONGER, 1996; UZAL et al., 2010). Os efeitos causados pela toxina beta são hemorragia ou necrose da mucosa do intestino delgado, podendo também causar efeitos neurológicos, acarretando em constrição arterial, o que pode resultar em morte súbita (NAGAHAMA et al., 1999; UZAL et al., 2010). Nestes casos, a morte parece ser resultado de toxemia pela toxina beta (SHATURSKY et al., 2000).

Presente nas fezes de animais experimentalmente infectados, a toxina alfa também foi descrita nas fezes de animais saudáveis e quando na corrente sanguínea, causando bradicardia, choque e falência múltipla de órgãos, letal (UZAL et al., 2010). Ao mesmo passo, a toxina beta age nas células intestinais, facilitando tanto a sua entrada, bem como a de outras toxinas, na corrente sanguínea (SONGER, 1996). Assim, sugere-se um sinergismo entre ambas as toxinas no propósito de causar doença (UZAL et al., 2010), de modo que uma vacina bivalente contra essas toxinas seria o ideal para controle de enterite necrótica e diarreia neonatal em suínos. Além disso, os tipos A e C produzem as toxinas alfa e beta e são descritos como responsáveis por causar diarreia neonatal em suínos, dando suporte à hipótese supracitada (YAEGER, 2007; SONGER e UZAL, 2005).

Apesar de infecções por *C. perfringens* tipos A e C serem mais comuns em suínos com poucos dias de vida, também são frequentes casos de intoxicações em bovinos adultos pelo tipo D, sendo as toxinas alfa e épsilon as responsáveis por causar doença e eventualmente morte (SILVEIRA et al., 1995 *apud* LOBATO et al., 2000; UZAL e SONGER, 2008). Também foram relatados casos de enterite necrótica em aves causadas por *C. perfringens*, cujo número de casos vem crescendo desde a última década devido à determinação da União Européia que

proíbe o uso de antibióticos na criação de aves (DAHIYA et al., 2006; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012), causando uma demanda para o desenvolvimento de vacinas como alternativa ao uso de antibióticos.

2.5 Dificuldades enfrentadas na produção de toxoides nativos

Bactérias do gênero *Clostridium* spp. são bacilos anaeróbios Gram positivos, formadores de esporos e de presença ubíqua (SMITH, 2009; UZAL et al., 2010). Geralmente crescem em no solo, água, alimentos e matéria orgânica em decomposição e no trato gastrointestinal de animais saudáveis. No caso do *C. perfringens*, os esporos podem estar presentes também em fezes de animais infectados (UZAL et al, 1997).

Atualmente, a prevenção contra clostridioses se dá pela vacinação com toxinas nativas inativadas por formaldeído (toxoides). A produção desses toxoides consiste no cultivo do *Clostridium* spp. de interesse e tratamento do sobrenadante do cultivo com formaldeído para detoxificação. Apesar de os toxóides terem sido utilizados como uma estratégia efetiva na proteção dos rebanhos, o cultivo, constante isolamento de cepas que produzam altos títulos de toxinas, purificação e detoxificação, passos inerentes à sua produção, apresentam dificuldades em escala industrial. Além disso, o baixo rendimento na produção de toxina pelo micro-organismo *in vitro*, o risco de intoxicação pela manipulação de grandes quantidades de toxina, a utilização de extrato bacteriano contendo proteínas de *Clostridium* spp., bem como a presença de formaldeído residual utilizado na detoxificação são alguns problemas enfrentados nesse processo, os quais podem influenciar a imunogenicidade e reatividade da vacina (NIJLAND et al., 2007; SMITH, 2009).

A partir dessa problemática, várias pesquisas têm sido realizadas com intuito de criar alternativas para a prevenção de clostridioses ou que contornem as dificuldades apresentadas pela produção de toxoides. Assim, a alternativa mais promissora parece ser a produção heteróloga das toxinas (ou domínios que possuam epitopos protetores) em sistemas tanto procarioto quanto eucarioto.

2.6 Vacinas recombinantes contra botulismo bovino tipos C e D e *C. perfringens* tipos A e C

***perfringens* tipos A e C**

A produção de vacinas recombinantes contra botulismo tem sido abordada através do uso da porção C-terminal da cadeia pesada das BoNTs, sendo que já foram produzidas vacinas recombinantes em *E. coli* para todos os sorotipos de botulismo e todas as formulações apresentaram proteção contra desafio em camundongos (BALDWIN et al., 2008). Já foram desenvolvidas, também, vacinas recombinantes para a toxina alfa (SCHOEPE et al., 2006) e beta (MILACH et al., 2012) de *Clostridium perfringens*, administrados tanto de forma separada como co-administradas ou fusionadas (ZENG et al., 2011). A toxina épsilon de *C. perfringens* também já foi clonada e expressa de forma heteróloga e avaliada como vacina recombinante de subunidade (GOSWAMI et al., 1996). O sistema de expressão em *E. coli* é o mais indicado, pois apresenta controle da expressão da proteína heteróloga por IPTG com altos níveis de rendimento, podendo ser otimizado para até mais de 450 mg/L-cultivo de proteína recombinante (YARI et al., 2010; 2012). Além disso, a possibilidade de trabalhar somente com a fração C-terminal da cadeia pesada, no caso das neurotoxinas botulínicas, elimina os riscos enfrentados quando se trabalha com a proteína nativa. Já para as toxinas de *C. perfringens*, as formas recombinantes apresentam menor ou nenhuma toxicidade (MILACH et al., 2012; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012).

O mesmo já foi feito em *Pichia pastoris* com exceção do sorotipo G, apresentando também bons resultados com desafio em camundongos (ZICHEL et al., 2010; DUX et al., 2011; WEBB et al., 2007; JOHNSON et al., 2003). Em relação a *C. perfringens*, o único trabalho relatando o uso de *P. pastoris* recombinante foi realizado por Gil de los Santos et al. (2012). No referido trabalho, aves foram alimentadas com *P. pastoris* recombinante contendo o gene da toxina alfa de *C. perfringens*, sendo observada diferença estatística na soroconversão em relação ao grupo controle, alimentado sem a adição de probióticos à ração. Apesar deste sistema também poder ser altamente regulado e apresentar altos níveis de expressão, proteínas bacterianas recombinantes não devem sofrer glicosilação quando expressas em sistema eucarioto, de modo que a expressão em *P. pastoris* deve ser intracelular. Como a parede celular dessa levedura é mais difícil de romper em comparação com a de *E. coli*, além de outras características metabólicas e maior proximidade filogênica com *Clostridium* spp., este último se torna uma alternativa mais agradável, além de ser um processo menos laborioso para obtenção e exploração de clones recombinantes.

Outras estratégias, explorada por poucos autores, são o uso de vírus ou sistemas de expressão livres de células (LEE et al., 2001; YU et al., 2009; TITBALL, 2009; ZICHEL et al., 2010). Apesar de eficientes no que tange a proteção contra desafios, tais estratégias são extremamente caras, tanto para cultivo celular como para compra de kits de expressão, a ponto de expressar antígenos suficientes para tornar a alternativa viável industrialmente, tornando essas alternativas interessantes apenas academicamente.

Os sistemas de expressão em *E. coli* e *P. pastoris* são os mais utilizados para produção de vacinas recombinantes pelo baixo custo e biossegurança que

oferecem, apesar de apresentarem desvantagens como a formação de corpos de inclusão comumente observada na expressão em *E. coli*, pirogênios da parede celular da bactéria e hiper-glicosilação das proteínas expressas em *P. pastoris*. Embora todas as vacinas produzidas e testadas mencionadas nesta revisão tenham obtido sucesso, somente vacinações experimentais foram relatadas até agora, não havendo trabalhos que demonstrem o desempenho de vacinas recombinantes de subunidade em espécies alvo da prevenção no que diz respeito a vacinas para botulismo. Já para *C. perfringens*, as vacinações experimentais induziram níveis de anticorpos neutralizantes que atendem ao estipulado pelo CFR9 (para antitoxina alfa) e pelo MAPA (para antitoxina beta) para animais de produção (SALVARANI, 2011; Anexo B).

2.7 Referências

BALDWIN, M. R.; TEPP, W. H.; PRZEDPELSKI, A.; PIER, C. L.; BRADSHAW, M.; JOHNSON, E. A.; BARBIERI, J. T. Subunit Vaccine against the Seven Serotypes of Botulism. **Infection and Immunity**, v.76, n.3, p.1314-1318, 2008.

BÖHNEL, H.; NEUFELD, B.; GESSLER, F. Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. **Veterinary Journal**, v.169, n.1, p.124-125, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49. Brasília: Diário Oficial da União; 12 de maio de 1997.

CHANDRAN, D.; NAIDU, S. S.; SUGUMAR, P.; RANI, G. S.; VIJAYAN, S. P.; MATHUR, D.; GARG, L. C.; SRINIVASAN, V. A. Development of a Recombinant Epsilon Toxoid against Entertoxemia and Its Use as a Combination Vaccine with Live

Attenuated Sheep Pox Virus against Enterotoxemia and Sheep Pox. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.6, p.1013-1016, 2010.

Code Of Federal Regulations - Title 9: Animals and Animal Products. December 2005. Disponível em <<http://cfr.vlex.com/vid/clostridium-perfringens-toxoid-19610636>> Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

COSTA, G. M.; SALVADOR, S. C.; PEREIRA, M. N. Botulismo em bovinos leiteiros no Sul de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2068-2071, 2008.

DAHYIA, J. P.; WILKIE, D. C.; VAN KESSEL, A. G.; DREW, M. D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, n.1-2, p.60-88, 2006.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, L. A. A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.2, p.43-48, 2001.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.2, p.115-119, 2005.

DUX, M. P.; HUANG, J.; BARENT, R.; INAN, M.; SWANSON, S. T.; SINHA, J.; ROSS, J. T.; SMITH, L. A.; SMITH, T. J.; HENDERSON, I. MEAGHER, M. M. Purification of a recombinant heavy chain fragment C vaccine candidate against botulinum serotype C neurotoxin [rBoNTC(H_C)] expressed in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v.75, n.2, p.177-185, 2011.

FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; FISHER, D. J.; POON, R.; SAYEED, S.; ADAMS, V., ROOD, J. I., McCLANE, B. A.; UZAL, F. A. Both epsilon-toxin and beta-toxin are

important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. **Infection and Immunity**, v.75, 1443-52, 2007. GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.448-451, 2012.

GONÇALVES, L. A.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F. Selection of a *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. **Archives of microbiology**, v.191, 847-51, 2009.

GOSWAMI, P. P.; RUPA, P.; PRIHAR, N. S.; CARG, L. C. Molecular Cloning of *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin Gene and Its High Level Expression in *E. coli*. **Biochemical and biophysical research and communications**, v. 226, n.3, p.735-740, 1996.

JOHNSON, S. K.; ZHANG, W.; SMITH, L. A.; HYWOOD-POTTER, K. J.; SWANSON, S. T.; SCHLEGEL, V. L.; MEAGHER, M. M. Scale-up of the fermentation and purification of the recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype F, expressed in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v.32, n.1, p.1-9, 2003.

KARALEWITZ, A. P.; BARBIERI, J. T. Vaccines against botulism. **Current Opinion on Microbiology**, v.15, n.3, p.317-324, 2012.

LEE, J. S.; PUSHKO, P.; PARKER, M. D.; DERTZBAUGH, M. T.; SMITH, L. A.; SMITH, J. F. Candidate Vaccine against Botulinum Neurotoxin Serotype A Derived

from a Venezuelan Equine Encephalitis Virus Vector System. **Infection and Immunity**, v.69, n.9, p.5709-5715, 2001.

LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R. A.; MARTINS, N. E.; GONÇALVES, L. C. B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4, 1-3, 2000.

MILACH, A.; GIL DE LOS SANTOS, J. R.; TURNES, C. G.; MOREIRA, A. N.; ASSIS, R. A.; SALVARANI, F. M.; LOBATO, F. C. F.; CONCEIÇÃO, F. R. Production and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant β toxoid. **Anaerobe**, v.18, n.3, p.363-365, 2012.

NAGAHAMA, M.; KIHARA, A.; MIYAWAKI, T.; MUKAI, M.; SAKAGUCHI, Y.; OCHI, S.; SAKURAI, J. *Clostridium perfringens* β -toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1454, p.97-105, 1999.

NIJLAND, R.; LINDNER, C.; HARTSKAMP, M.; HAMOEN, L. W.; KUIPERS, O. P. Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* β -toxoid in closely related Gram-positive hosts. **Journal of Biotechnology**, v.127, n.3, p.361-372, 2007.

RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F. H.; ANCHARSKI, D. M.; ELIAS, M. D.; SINGH, A. K.; SHAMIN, M.; GONG, Y.; SIMPSON, L. L. Trivalent Vaccine against Botulinum Toxin Serotypes A, B, and E That Can Be Administered by the Mucosal Route. **Infection and Immunity**, v.75, n.6, p.3043-3054, 2007.

SALVARANI, Felipe Masiero. **Clostrídios entéricos de leitões neonatos, desenvolvimento e avaliação de uma vacina experimental**. 2011. 62f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHOEPE, H.; WIELER, L. H.; BAUERFEIND, R.; SCHLAPP, T.; POTSCHKA, H.; HEHNEN, H.; BALJER, G. Neutralization of hemolytic and mouse lethal activities of *C. perfringens* alpha-toxin need simultaneous blockade of two epitopes by monoclonal antibodies. **Microbial Pathogenesis**, v.23, n.1, p.1-10, 1997.

SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, B. H.; SONGER, J. G.; TWETEN, R. K. *Clostridium perfringens* Beta-Toxin Forms Potential-Dependent, Cation-Selective Channel in Lipid Bilayers. **Infection and Immunity**, v.68, n.10, p.5546-5551, 2000.

SIMPSON, L. L. Identification of the major steps in botulinum toxin action. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v.44, p.167-193, 2004

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v.27, p.D33-9, 2009.

SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical microbiology reviews**, v.9, p.216-34, 1996.

SONGER, J.; UZAL, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.17, n.6, p.528-536, 2005.

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Anaerobe**, v.5, p.51-64, 1999.

TITBALL, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. **Vaccine**, v.27, p.D44-D47, 2009.

TURTON, K.; CHADDOCK, J. A.; ACHARYA, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.27, n.11, p.552-558, 2002.

UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; KELLY, W. R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. **Letters in applied microbiology**, v.25, n.5, p.339-344.

UZAL, F. A.; VIDAL, J. E.; MCCLANE, B. A.; GURJAR, A. A. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. **The Open Toxinology Journal**, v.3, p.24-42, 2010.

UZAL, F. A.; SONGER, J. G. Diagnosis of *Clostridium Perfringens* Intestinal Infections in Sheep and Goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.253-265, 2008.

YAEGER, M.Y. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. In: 38th ANNUAL MEETING AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIAN. 2007. ORLANDO, p.101-103, 2007

YARI, K.; FATEMI, S. S.; TAVALLAEI, M. Optimization of BoNT/A-Hc expression in recombinant *Escherichia coli* using the Taguchi statistical method. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.56, n.1, p.35-42, 2010.

YARI, K.; FATEMI, S. S.; TAVALLAEI, M. High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v.35, n.3, p.407-414, 2012.

YU, Y.; YU, J.; LI, N.; WANG, S.; YU, W.; SUN, Z. Individual and bivalent vaccines against botulinum neurotoxins serotypes A and B using DNA-based Semliki Forest virus vectors. **Vaccine**, v.27, n.44, p.6148-6153, 2009.

WEBB, R. P.; SMITH, T. J.; WRIGHT, P. M.; MONTGOMEY, V. A.; MEAGHER, M. M.; SMITH, L. A. Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v.25, n.21, p.4273-4282, 2007.

WILLIAMSON, E. D.; TITBALL, R. W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. **Vaccine**, v.11, p.1253-1258, 1993.

ZENG, J.; DENG, G.; WANG, J.; ZHOU, J.; LIU, X.; XIE, Q.; WANG, Y. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows. **Vaccine**, v.29, n.33, p.5459-5466, 2011.

ZICHEL, R.; MIMRAN, A.; KEREN, A.; BARNEA, A.; STEINBERGER-LEVY, I.; MARCUS, D.; TURGEMAN, A.; REUVENY, S. Efficacy of a Potential Trivalent Vaccine Based on Hc Fragments of Botulinum Toxin A, B and E Produced in a Cell-Free Expression System. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.5, p.784-792, 2010.

3 RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

3.1 INTRODUÇÃO

Esta seção tem por objetivo descrever, de forma didática, atividades realizadas durante o período de estágio supervisionado utilizadas para a produção de uma bacterina recombinante, bem como as técnicas empregadas para produzir uma vacina recombinante de subunidade.

Aqui são descritas técnicas de cultivo bacteriano, clonagem molecular, expressão de proteínas heterólogas em sistema procarioto, técnicas de purificação de proteínas recombinantes e técnicas imunológicas para caracterização das mesmas. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas a não ser que especificado o contrário.

3.2 Cultivo de *E. coli* e preparação de células eletrocompetentes

Escherichia coli TOP10 ou *E. coli* BL21 (DE3) Star, quando para expressão da proteína heteróloga, foram cultivadas para a preparação de células eletrocompetentes para transformação por eletroporação. Primeiramente, uma semente do estoque foi plaqueada em ágar Luria-Bertani (LB; 10g triptona, 5g extrato de levedura, 10g cloreto de sódio, volume final de 1L, pH 7,0; 1,5% (w/v) ágar bacteriológico) por esgotamento e cultivada por 16h em estufa a 37°C. Em seguida, uma única colônia foi inoculada em 50mL de caldo LB e cultivada por 16 – 18h a 37°C sob agitação (250rpm). No terceiro dia, usou-se a cultura do dia anterior (após aproximadamente 16 horas) para inocular 450mL de caldo LB, o qual foi

cultivado, nas condições supracitadas, até a fase de crescimento exponencial ($DO_{600} = 0,4$). Ao atingir tal fase de crescimento, o cultivo foi resfriado em banho de gelo e centrifugado (1000g, 4°C, 15min). Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500mL de água estéril. Em seguida, procederam-se mais duas etapas de centrifugação conforme já citado, lavando-se o pellet com 250 e 10mL de glicerol 10% (4°C). Por último, o pellet foi ressuspendido em 1mL de meio GYT (10% (v/v) glicerol, 0,125% (w/v) extrato de levedura, 0,25% (w/v) triptona) gelado e a concentração de células ajustada para 2×10^3 a 3×10^3 por mL por espectrofotometria. Alíquotas de 40 μ L foram congeladas a -70°C até uso futuro.

As condições de cultivo aqui descritas para *E. coli* foram usadas nos demais passos nos quais o cultivo dessa bactéria foi necessário.

3.3 Clonagem molecular e transformação de *E. coli*

Um gene sintético codificando uma quimera composta por toxinas de *C. perfringens* foi desenhado *in silico* com auxílio do software Vector NTI 11 (Invitrogen) e informações do *GenBank* e sintetizados pela Epoch Biolabs (EUA). Detalhes serão omitidos por motivo de intenção de depósito de patente envolvendo as construções. A quimera consiste em 3 genes, sendo aqui descrito o processo de clonagem somente do último gene que terá o pseudônimo de *clos3* (rCLOS3 quando referente à proteína recombinante). Além de sequências codificadoras para as proteínas de interesse, foram inseridos *linkers* compostos por $(Gly_4Ser)_3$ (ŠKRLJ et al, 2011) entre cada domínio das quimeras, bem como sítios para enzimas de restrição nas extremidades de cada domínio.

O gene sintético foi entregue pela referida empresa clonado no vetor de clonagem pUC19. Para a clonagem do gene *clos3*, procedeu-se digestão com

enzimas de restrição, seguida por eletroforese em gel de agarose para separação, por diferença de massa molecular, do inserto e do vetor. Digestão com as mesmas enzimas foram realizadas com o vetor de expressão em sistema procarioto pAE. Esse vetor fusiona uma cauda de histidina à proteína heteróloga, possibilitando sua identificação por *Western blot*, além de sua purificação por cromatografia de afinidade com níquel. As reações de digestão geralmente se dão de acordo com instruções do fabricante das enzimas. Majoritariamente, os tampões são fornecidos concentrados 10X e diluídos para 1X para uso. A quantidade de enzima usada depende da quantidade de DNA, tempo de reação e concentração da enzima, podendo usar-se de 0,5 a 1µL. Pode-se realizar digestão dupla (com 2 endonucleases) caso o tampão seja compatível com ambas, desde que os controles apropriados sejam realizados. Neste trabalho, as reações foram feitas a 37°C por um mínimo de 2 horas conforme Tabela 1.

Tabela 1: Exemplificação de reação de digestão com enzimas de restrição.

Componente da reação	Volume
DNA (vetor e/ou inserto)	20 µL
Tampão 10X	2,5 µL
Enzima	1 µL
H ₂ O	1,5 µL
Volume final	25 µL

Após a digestão, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar se aquela foi efetiva, conforme Figura 1. Verificou-se a eficácia da digestão por linearização do pAE (aparece uma única banda – Fig. 1A) ou pela liberação de fragmento (inserto) no caso da digestão do pUC19 com o gene sintético (Fig. 2B). Neste caso, como a digestão dupla de ambos os vetores foi realizada simultaneamente e a liberação ou não do inserto correspondente a *clos3* serviu

como controle sobre a atividade enzimática, bem como o padrão de bandas da digestão de pUC19/*clos3*.

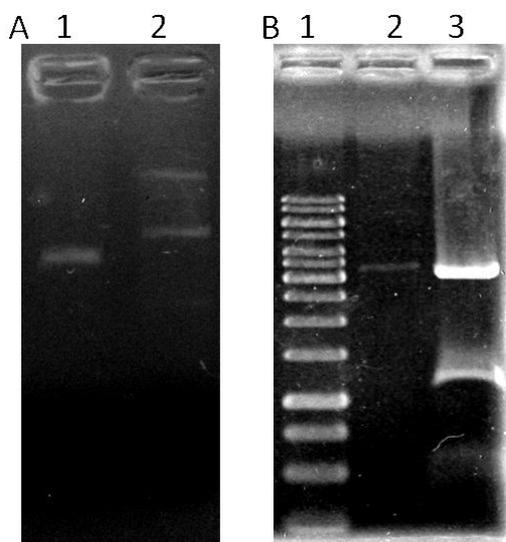


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar digestões do gene *clos3* e do vetor pAE. A: Digestão enzimática do vetor pAE. 1: pAE digerido com *NcoI* e *XhoI*; 2: vetor pAE circular. B: Digestão do vetor pUC19/*clos3*. 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 2: pUC19/*clos3* circular; 3: pUC19/*clos3* digerido com *NcoI* e *XhoI*.

Após a purificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a quantificação, tanto do vetor como do inserto, por espectrofotometria e comparação da intensidade de bandas com as do marcador λ *HindIII* em gel de agarose. Para a reação de ligação, usou-se uma proporção molar de uma parte de vetor para três partes de inserto, 10% (v/v) de tampão e 2U de T4 DNA ligase (Fermentas) a 22°C por 1h. Após inativação da enzima por calor (70°C, 5min), usou-se um volume da reação necessário para conter cerca de 10ng de DNA para transformar *E. coli* TOP10 eletrocompetente.

A eletroporação consiste em utilizar um choque elétrico para formar poros na parede celular da bactéria e permitir a entrada do DNA exógeno (no caso, plasmídeo recombinante). Para tal procedimento, uma alíquota de células eletrocompetentes foi

transferida para cubetas de eletroporação geladas, juntamente com a quantidade apropriada de DNA (2 μ L do produto da reação de ligação). O pulso elétrico segue os seguintes parâmetros: 25 μ F de capacitância, voltagem de 2,5kV e 200 ohms de resistência. Do momento de transferir as células para a cubeta até o choque, todo procedimento deve ser feito em banho de gelo (aproximadamente 4°C). Após o pulso, adicionou-se 1mL de LB e encubou-se por uma hora nas condições especificadas no capítulo 3.2. Em seguida, plaqueou-se o cultivo em LB sólido com o antibiótico apropriado para seleção. No caso, utilizou-se 100 μ g/mL de ampicilina.

A triagem dos recombinantes foi realizada misturando-se parte de cada colônia com 15 μ L de fenol-clorofórmio e 15 μ L de tampão de triagem (100 μ L de tampão de amostra 6X, 900 μ L de água milli-Q e 1 μ L de RNase). Após agitar a mistura por vortex, a mesma foi centrifugada para separar o DNA (genômico e plasmidial) das demais partes celulares. O sobrenadante, contendo os ácidos nucleicos, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando a massa molecular do DNA plasmideal das amostras com a do vetor circular sem inserto (controle) (Fig. 2). As amostras que apresentaram DNA plasmideal com maior massa molecular foram consideradas recombinantes. As colônias recombinantes foram então cultivadas em caldo LB com antibiótico para extração de plasmídeo (realizada com kit GE Healthcare illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit). Assim, obtiveram-se plasmídeos recombinantes contendo o gene *clos3* para expressão em sistema procarioto (Fig. 3), onde pode-se observar a presença do promotor T7 e sequência para adição da cauda de histidina para purificação através de cromatografia de afinidade ao níquel.

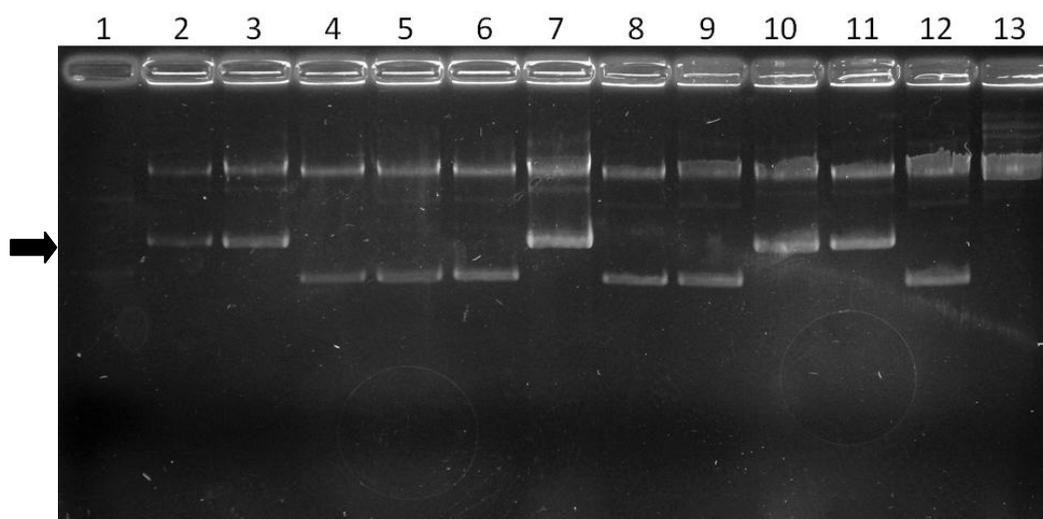


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 0,8% para triagem dos clones recombinantes. 1: pAE circular sem inserto. 2-13: transformantes triados. Os clones nas linhas 2, 3, 7, 10 e 11 foram considerados recombinantes. A seta indica o plasmídeo recombinante. DNA marcado por brometo de etídeo.

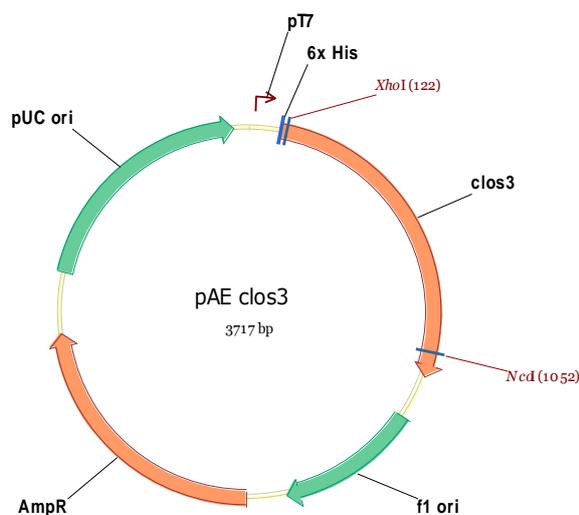


Figura 3: Mapa do vetor de expressão pAE/clos3. Imagem obtida através do software Vector NTI11 (Invitrogen).

A caracterização dos clones foi realizada por digestão com as mesmas enzimas usadas para a clonagem (Fig. 4). Todos os clones liberaram inserto de massa molecular esperada e foram considerados recombinantes, sendo então usados no próximo passo. A cultura do clone 11 não apresentou crescimento.

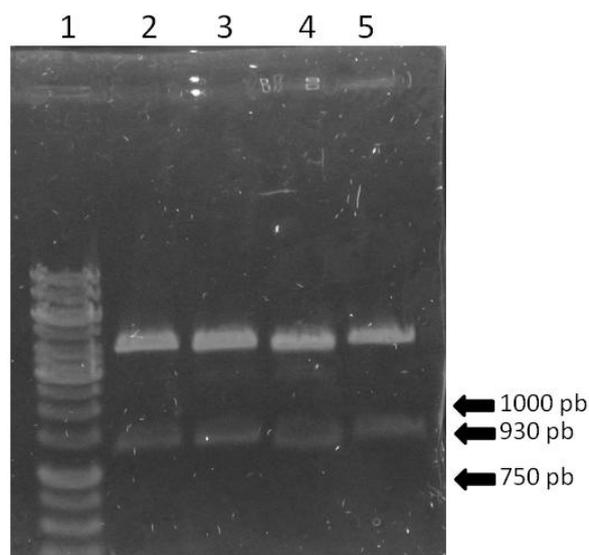


Figura 4: Caracterização enzimática dos clones recombinantes. 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder ; 2: Clone 2; 3: Clone 3; 4: Clone 7; 5: Clone 11. Devido à liberação da banda correspondente ao insert, todos os clones foram considerados recombinantes.

3.4 Expressão heteróloga da rCLOS3 em sistema procarioto e produção de bactéria recombinante

Após a obtenção de clones recombinantes contendo os genes de interesse, *E. coli* BL21 (DE3) Star foi transformada conforme já descrito. Essa cepa foi escolhida por estar engenheirada para favorecer a super expressão de genes heterólogos com *knock in* do gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor do operon lac, permitindo a expressão de genes sob controle do promotor T7, como é o caso dos genes de interesse clonados em pAE, além do *knock out* de genes de RNases (INVITROGEN). Após a transformação, foi cultivado um pré-inóculo de 10mL de LB contendo 100µg/mL de ampicilina para cada clone. No dia seguinte, 9mL de LB com a mesma quantidade de ampicilina foi inoculado com 1mL (10% do volume final de cultivo) de pré-inóculo e a densidade óptica a 600nm (DO_{600}) foi monitorada até atingir valor entre 0,6 e 0,8 (terço final da fase logarítmica de crescimento), momento no qual a expressão da proteína heteróloga foi induzida pela adição de 0,5mM de

isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). O mesmo processo foi escalonado para cultivo de 500mL, mantendo-se todas as proporções descritas. O período de expressão foi de 3h, após o qual as células foram centrifugadas para purificação da proteína recombinante (Capítulo 3.5) ou inativadas através da adição de 0,2% (v/v) de formaldeído ao cultivo, sendo o mesmo incubado por no mínimo 16h sob agitação (250rpm) a 37°C para inativação das bactérias. Esse processo foi confirmado por cultivo em ágar LB de uma alíquota de 100 μ L do cultivo após incubação com formaldeído, momento no qual o cultivo foi centrifugado (10.000g, 4°C, 10min) e lavado com PBS estéril para remoção de formaldeído residual. O *pellet* foi ressuspendido em PBS estéril e a concentração de células ajustada para 10⁸ a 10⁹ células por mililitro com auxílio de microscopia em campo escuro para contagem em câmara de Petroff-Hausser. A expressão da proteína heteróloga foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Fig. 5) e confirmada conforme Capítulo 3.5.

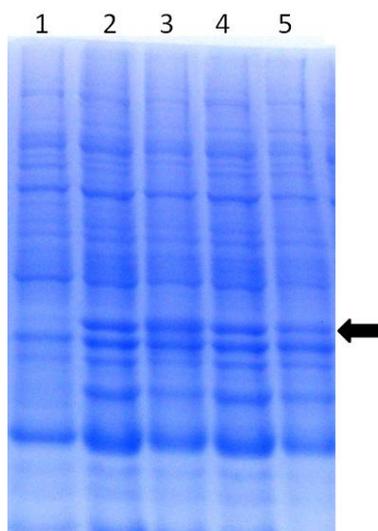


Figura 5: Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% para verificar a expressão da proteína rCLOS3. 1: Extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2-5: extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com os clones recombinantes induzido com 0,5 mM IPTG por 3 horas. A seta

indica a banda extra nos cultivos induzidos por IPTG, provavelmente representando a expressão da proteína heteróloga.

As condições de cultivo durante esse passo foram conforme Capítulo 3.2.

3.5 Western blot para caracterização da proteína recombinante

Uma amostra de 1mL de cultivo após a indução por 3h com IPTG foi coletada, centrifugada e preparada para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A preparação foi realizada pela centrifugação da amostra coletada (velocidade máxima, 1min), ressuspensão do *pellet* em 90 μ L de PBS e 10 μ L de tampão de amostra 5X (250mM Tris pH 6,8; 1% (w/v) SDS; 50% (v/v) glicerol; 5% (v/v) β -mercaptoetanol; 0,15g azul de bromofenol) e fervura (100°C) por 10min.

Para a análise da expressão da proteína heteróloga, foi realizada técnica de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-polihistidina. Para tanto, um marcador de massa molecular de proteínas pré-corado, extrato protéico bruto de um cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada (densidade celular aproximada àquela do cultivo para expressão das proteínas heterólogas) e a amostra citada no início deste capítulo foram carregadas em um gel de poliacrilamida 12%. Em seguida da corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de corrida é preparado concentrado 5X e diluído para 1X na hora de uso e consiste (concentrado) de 25mM Tris-base, 250mM glicina e 0,1% SDS. Já o tampão de transferência é preparado diretamente na concentração de uso e consiste de 39mM glicina, 48mM Tris-base, 0,037% SDS e 20% metanol. O pH, em ambos os casos, deve ser ajustado para 8,3. Ressalta-se o fato de haver outros protocolos para preparação de tais tampões, variando um pouco a molaridade dos

componentes, não havendo variação do pH. Os protocolos supracitados foram aqueles utilizados nas atividades aqui descritas.

Após o período de transferência (1h, 400mA), a membrana foi corada com solução de Ponceau 5X para verificar se a mesma de fato ocorreu. Quando um marcador pré-corado é usado, o mesmo pode servir como controle da transferência. A membrana foi lavada diversas vezes com PBS adicionado de 0,05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) até todo Ponceau ser removido, sendo a mesma então bloqueada com 5% (w/v) de leite em pó desnatado diluído em PBS-T *overnight* a 4°C. Entre cada passo seguinte a membrana foi lavada com PBS-T três vezes, exceto após a incubação com o anticorpo secundário, quando a membrana foi lavada por 40min. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-histidina diluído 1:4000 em PBS-T e, subsequentemente, com anticorpo anti-anticorpo de camundongo (1:6000), ambos diluídos em PBS-T. As duas etapas foram realizadas por 1h a temperatura ambiente. Após a última etapa de lavagem, a membrana foi incubada com soluções de kit comercial para revelação por quimiluminescência. Brevemente, a membrana foi incubada com solução contendo substrato para peroxidase e luminol e, após, exposta a um filme de raio X, que foi então revelado com soluções para revelação de filme fotográfico (Kodak). A técnica de *Western blot* também pode ser usada para verificar se a proteína recombinante mantém antigenicidade, diagnóstico e detecção de patógenos em amostras entre outras aplicações. Na Figura 6 é demonstrado o resultado da técnica descrita acima, confirmando a expressão da rCLOS3.

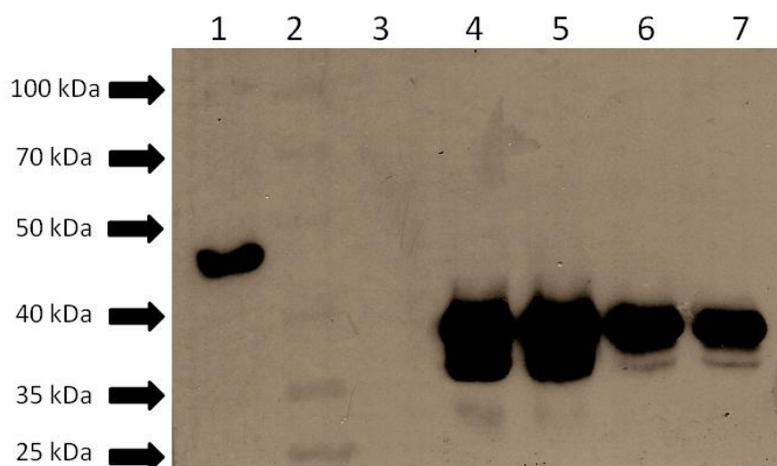


Figura 6: Western blot com anticorpo anti-histidina para confirmação da expressão da rCLOS3. 1: rCLOSD (controle positivo); 2: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 3: Extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 4-7: Extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com os clones recombinantes após indução com 0,5 mM IPTG por 3 horas.

Alternativamente, pode-se usar ensaio imunoenzimático (ELISA), uma vez que a técnica de *Western blot* emprega proteínas desnaturadas pela presença de SDS no gel de poliacrilamida usado previamente, eliminando epitopos conformacionais, conforme realizado no capítulo “Caracterização das quimeras recombinantes” do Anexo A. Contudo, *Western blot* é uma técnica com maior especificidade, ao passo que ELISA fornece resultados mensuráveis, possibilitando a aplicação de testes estatísticos para estabelecer diferença entre as amostras. Brevemente, ao invés de saber-se o que está reagindo, sabe-se o quanto está reagindo e usa-se isso como parâmetro para inferir se houve ou não expressão da proteína recombinante de interesse. Essa alternativa é mais empregada quando se usa soros específicos para determinada proteína para caracterizá-la. Como no referido capítulo a absorbância das amostras foi estatisticamente superior as do controle negativo, considerou-se que houve expressão heteróloga, fato suportado por haver reação com anti-histidina no *Western blot*.

3.6 Purificação da rCLOS3

Após centrifugar o cultivo, as células foram lisadas por incubação com lisozima (1mg/mL) durante 1 hora a temperatura ambiente em tampão de lavagem (19,5mM NaH₂PO₄; 500mM NaCl; 10mM imidazole; pH 8,0; água milli-Q q.sp. 1L), sonicadas (6 ciclos de 30s, amplitude 40) e centrifugadas (10.000 x g, 15min, 4°C). O sobrenadante, contendo proteínas solúveis, foi armazenado a -20°C até uso futuro e o pellet foi suspenso em tampão de lavagem acrescido de 0,2% (w/v) N-lauroylsarcosine (NLS) e incubado por 16h a 4°C. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi armazenado a -20°C e o *pellet* ressuspendido em tampão de lavagem com 8M de ureia conforme descrito, seguida de uma nova centrifugação, após a qual foi realizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% para verificar em que fração a proteína recombinante encontrava-se (Fig. 7).

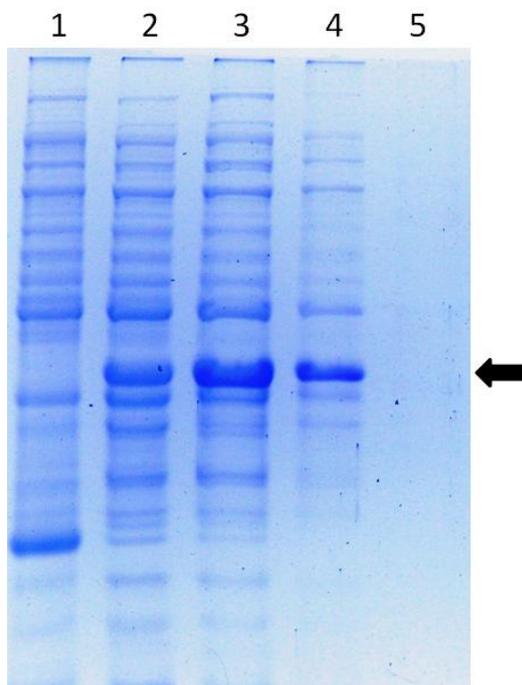


Figura 7: Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%. 1: Extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2: Extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*clos3* induzida por 3 horas com IPTG; 3: Sobrenadante da lise do extrato protéico bruto de *E. coli* BL21 (DE3) Star

transformada com pAE/*clo3* induzida por 3 horas com IPTG; 4: Proteínas solubilizadas com tampão de lavagem acrescido de 0,2% NLS; 5: Proteínas solubilizadas com tampão de lavagem acrescido de 8 M. A seta indica a banda correspondente à rCLOS3.

Neste caso, observou-se que a proteína recombinante encontra-se na fração solúvel (sobrenadante da lise – canaleta 3) e nas proteínas solubilizadas com 0,2% NLS (canaleta 4). Não há proteínas solubilizadas pela ureia. A partir disso, prosseguiu-se purificação da proteína recombinante solúvel por cromatografia de afinidade com níquel. Uma coluna HisTrap FF (GE Healthcare) foi equilibrada com 5 volumes de tampão de lise previamente à passagem de aproximadamente 10mL de extrato protéico. Após a lavagem para remover proteínas de *E. coli*, a proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (mesma composição do de lavagem, porém com 500mM imidazole). A purificação das proteínas foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida 12% (Fig. 8). As alíquotas contendo proteína recombinante pura foram dialisadas contra PBS a 4°C por 16h para remoção do imidazole e liofilizadas para armazenamento até uso futuro.

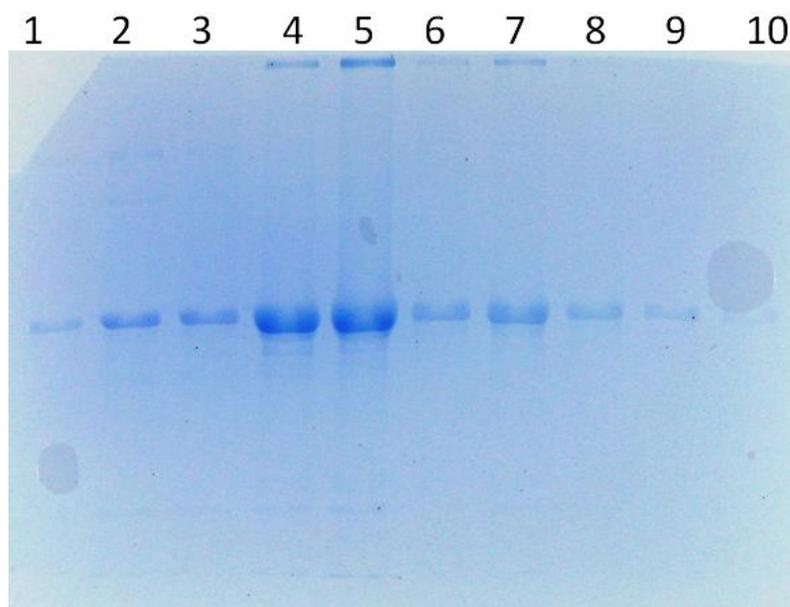


Figura 8: Eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida 12% para verificar a purificação da rCLOS3.

Os poços contêm as alíquotas da purificação com o respectivo número. As bandas são correspondentes à

rCLOS3 purificada. Como todas as amostras reagiram em *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-his, acredita-se que as banda de maior massa molecular aparente sejam unidade oligomerizadas da proteína.

3.7 Redação de trabalhos científicos

No início do segundo semestre de 2012, recebemos resultados do ensaio de soroneutralização em camundongos. O ensaio foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) durante o primeiro semestre de 2012 com soro de camundongos e cobaias vacinados de forma experimental com a quimera recombinante rLTB/HC_C/HC_CD. Os dados foram então analisados, nos permitindo escrever o artigo que se encontra presente no Anexo A.

Além disso, também nos foi possível escrever um resumo expandido (Anexo B) com dados similares provenientes da vacinação de porcas prenhas com toxoides recombinantes alfa e beta de *C. perfringens*, sendo o mesmo submetido ao VI Simpósio de Microbiologia Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada ocorrido da UFRGS de 5 a 8 de novembro de 2012.

3.8 CONCLUSÃO

Conclui-se esta seção ressaltando a importância do conhecimento, tanto teórico quanto prático, sobre técnicas de biologia molecular, microbiologia e imunologia, chamando atenção para as diversas aplicações dessas técnicas, tanto separadas quanto em conjunto no que diz respeito à produção de imunobiológicos como antígenos vacinais e testes diagnósticos.

Uma vez que é comum ocorrerem problemas que resultem no funcionamento não esperado da técnica, resalta-se também a necessidade de experiência prática e conhecimento empírico para solucionar tais imprevistos. Além do mais, as discussões técnicas e sobre artigos científicos, que impreterivelmente ocorrem no

grupe de pesquisa do laboratório, tanto quanto com colegas da graduação, pós-graduação e/ou professores, são essenciais para adquirir novos conhecimentos e alternativas para alguma técnica ou problema a ela relacionado.

3.9 REFERÊNCIAS

INVITROGEN. One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli*.

Disponível em: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C601003>>. Acesso em: 16/11/2012.

PIERCE. ECL Western Blotting Substrate. Disponível em:

<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=560371F1-8179-4323-92AD-4A96296F8929>>. Acessado em: 16/11/2012.

SAMBROOK J, RUSSEL DW: Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448p.

ŠKRLJ, N.; VRANAC, T.; POPOVIĆ, M.; ŠERBEC, V. C.; DOLINAR, M. Specific Binding of the Pathogenic Prion Isoform: Development and Characterization of a Humanized Single-Chain Variable Antibody Fragment. *PloS one*, v.6, n.1, p.e15783, 2011.

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine*, v.27, p.D33-9, 2009.

TORTORA, GJ et al. *Microbiologia*. 8ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2005. 894p.

SIGMA-ALDRICH: Anti-Mouse IgG IgA IgM (H+L)-Peroxidase antibody produced in goat. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/SAB3701047?lang=pt®ion=BR>>. Acessado em: 16/11/2012.

ANEXOS

ANEXO A**Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against*****Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D**

Running title: Chimeric vaccine against botulism types C and D

Luciana A. F. Gil¹; Carlos Eduardo P. da Cunha²; Gustavo M. S. G. Moreira²; Felipe M. Salvarani³; Ronnie A. Assis³; Francisco Carlos F. Lobato³; Marcelo Mendonça²; Odir A. Dellagostin²; Fabricio R. Conceição^{2*}

¹Faculdade de Veterinária, ²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

³Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 567, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: þ55 53 32757583; fax: þ55 53 32757350. E-mail:

fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

Abstract

Bovine botulism is a fatal disease that is caused by botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum* serotypes C and D and that causes great economic losses, with nearly 100% lethality during outbreaks. It has also been

considered a potential source of human food-borne illness in many countries. Vaccination has been reported to be the most effective way to control bovine botulism. However, the commercially available toxoid-based vaccines are difficult and hazardous to produce. Neutralizing antibodies targeted against the C-terminal fragment of the BoNT heavy chain (HC_C) are known to confer efficient protection against lethal doses of BoNTs. In this study, a novel recombinant chimera, consisting of *Escherichia coli* heat-labile B subunit (LTB), a strong adjuvant of the humoral immune response, fused to the HC_C of BoNT serotypes C and D, was produced in *E. coli*. Mice vaccinated with the chimera containing LTB and an equivalent molar ratio of the chimera without LTB plus aluminum hydroxide ($Al(OH)_3$) developed 2 IU/mL of antitoxins for both serotypes. Guinea pigs immunized with the recombinant chimera with LTB plus $Al(OH)_3$ developed a protective immune response against both BoNT/C (5 IU/mL) and BoNT/D (≥ 10 IU/mL), as determined by a mouse neutralization bioassay with pooled sera. The results achieved with guinea pig sera fulfilled the requirements of commercial vaccines for prevention of botulism, as determined by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply. The presence of LTB was essential for the development of a strong humoral immune response, as it acted in synergism with $Al(OH)_3$. Thus, the vaccine described in this study is a strong candidate for the control of botulism in cattle.

Introduction

Botulism is a severe and fatal disease characterized by flaccid paralysis due to the inhibition of acetylcholine release at the neuromuscular junction caused by the botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium barati*, *C. butyricum*, *C. argentinense* and, most commonly, by *C. botulinum* [1], a Gram-positive anaerobe rod and spore-forming bacteria present in soil, water and decaying organic matter. There are seven serotypes of BoNTs (A-G) that vary antigenically, though they have the same pharmacological activity [2].

In many countries, including Brazil, BoNT serotypes C and D are responsible for causing botulism in cattle [3–5]. Cattle with calcium and phosphorus deficiencies often resort to bone chewing to supplement their lack of minerals, which is the main cause of endemic botulism [6]. Dutra et al. [7] reported seven outbreaks of bovine botulism in Brazil, which were associated with contaminated water and resulted in 99.92% lethality. In another study [8], the same authors reported more than seven outbreaks of bovine botulism due to contaminated bedding for poultry, resulting in 3,299 dead animals. More recently, Costa et al. [9] reported an outbreak of bovine botulism caused by serotypes C and D present in contaminated food, with 100% lethality in a dairy-producing property. Outbreaks of botulism have also been reported in Europe [9,10] and North America [11], where there is also great concern that

infected animals will become a source of food-borne botulism for humans. Therefore, this disease is one of the main causes of cattle death and, consequently, of great economic losses; in addition, it is a matter of concern for public safety worldwide.

Vaccination is the most effective method to prevent death via BoNT poisoning [12,13]. Current commercial vaccines are produced by inactivated native toxins (toxoids) combined with conventional adjuvants, which, although efficient, present some production limitations: (1) the amount of toxin produced *in vitro* is unpredictable, and (2) BoNTs are the most potent biological toxins known in nature [14], and therefore high levels of biosafety are required [13]. Thus, it is critical to develop new strategies that can overcome these problems.

BoNTs are synthesized as single polypeptide chain prototoxins and are activated by enzymatic cleavage by *C. botulinum* proteases [1]. The activated forms of the toxins are composed of two chains and three characteristic domains. The light chain is a Zn²⁺-metalloprotease, which is connected to the N-terminal half of the heavy chain domain (translocation domain, HC_N) by a single disulfide bond [15]. The C-terminal region of the heavy chain (i.e., the binding domain of the neuronal receptor, HC_C) comprises the region that interacts with neurons. Additionally, the C-terminal region contains a nontoxic domain that possesses protective epitopes [16]. It has already been shown that subunit vaccines made of recombinant HC_C, produced in either

Escherichia coli or *Pichia pastoris*, are capable of inducing neutralizing antibodies and protection against botulism [12,17–21]. Consequently, recombinant subunit vaccines are interesting strategies to solve the problems inherent to toxoid vaccine production.

Chimeric proteins carrying epitopes from different pathogens, linkers, or adjuvant sequences offer increased immunogenicity for recombinant antigens and can also elicit broad immune responses [22–24]. In this study, using only one fermentative and downstream process, we developed a chimeric vaccine, consisting of the HC_C region of BoNT serotypes C and D fused to the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB), a potent adjuvant of the humoral immune response [25–27]. We then further evaluated the immunogenicity of this vaccine in animal models.

Material and Methods

Gene synthesis and cloning

A synthetic gene encoding the fused HC_C of BoNT serotypes C and D (HC_CC/HC_CD) was synthesized by Epoch Biolabs, Inc. (USA) with optimal codon usage for *E. coli*. Restriction sites were added to allow cloning into the pAE and pAE//*ltb* expression vectors [25] for *E. coli* (Table 1). A three-glycine linker (3xGly) was added between the two HC_Cs to enable the proper folding of each HC_C. DNA manipulation was

performed according to the protocols previously described by Sambrook and Russel [27]. Briefly, after digestion, electrophoresis on an agarose gel was performed. Bands representing the fragments encoding proteins of interest and expression vectors were purified from the gel or digestion reactions, respectively, using the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and illustra GFX PCR DNA. After purification, the inserts and vectors were quantified and ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs). The ligation products were used to transform TOP10 *E. coli*, which were cultured overnight on LB agar with 100 µg/mL ampicillin. Bacterial clones were screened for recombinants. Plasmid DNA was extracted using the alkaline lysis method [27], and recombinant clones were characterized by endonuclease digestion.

Expression and purification of the recombinant chimeras

The recombinant vectors were transformed into BL21 (DE3) Star *Escherichia coli* by the heat shock method [30]. Bacteria transformed with each recombinant vector were grown in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with 100 µg/mL of ampicillin in a shaker (37 °C, 150 RPM) until the mid-log growth phase ($OD_{600}=0.6-0.8$). Heterologous protein expression was induced for 3 h by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM. The cells were harvested by centrifugation (16,000 x g, 10 min, 4 °C), suspended in lysis buffer (0.2

M NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole), incubated with 50 µg/mL of lysozyme for 1 h at room temperature, disrupted by sonication and centrifuged again (10,000 x g, 30 min, 4 °C). The pellets with inclusion bodies were washed three times with lysis buffer and incubated overnight at 4 °C with lysis buffer supplemented with 0.2% or 0.4% (w/v) N-lauroylsarcosine (NLS) and centrifuged again (10,000 x g, 30 min, 4 °C). The recombinant proteins was purified by affinity chromatography, using HisTrap™ HP 1 ml columns pre-packed with pre-charged Ni Sepharose™ on the ÄKTAprime™ automated liquid chromatography system (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Purified fractions were dialyzed against PBS (pH 7.4) with 0.05% (v/v) Triton X-100 overnight and lyophilized until further use. Protein quantification was performed using the BCA™ Protein Assay (Pierce). The purity and integrity of the recombinant antigens were evaluated by 12% SDS-PAGE.

Characterization of the recombinant chimeras

Expression and purification of the recombinant chimeras were confirmed by Western blot using an anti-polyHistidine antibody (Sigma-Aldrich). The antigenicity of the chimeras was subsequently evaluated by ELISA using an anti-cholera toxin antibody (Sigma-Aldrich) for the construct containing LTB, and standard antitoxins for

serotypes C and D (kindly donated by Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais - LANAGRO/MG, Brazil).

Mice and guinea pig vaccination

Female Swiss mice, 6 to 8 weeks old, were randomly segregated into 5 groups of 10 animals each. Group one was comprised of animals vaccinated with 50 µg of rLTB/HCC_C/HCC_D without conventional adjuvant to evaluate the potential of rLTB as a humoral immune response adjuvant. Group two was comprised of animals vaccinated with 50 µg of rLTB/HCC_C/HCC_D plus a 15% aluminum hydroxide suspension (Al(OH)₃). Group three was comprised of animals vaccinated with the same molar ratio of rHCC_C/HCC_D plus 15% Al(OH)₃. Group four was comprised of animals vaccinated with a commercial toxoid vaccine; the dose used was 1/20 of the dose recommended for cattle. Group five (control group) was comprised of animals vaccinated with 200 µL sterile phosphate-buffered saline (PBS). Three doses were administered intraperitoneally on days 0, 14 and 28. Blood samples were collected on day 35 from the retro-orbital plexus, and sera were separated by centrifugation (5 min; 3,000 x g), pooled and frozen until further use.

Guinea pigs were vaccinated subcutaneously on days 0 and 21 with 200 µg of each chimera. The groups, each with 10 randomly sorted animals, were the same as those

described above for the experiments in mice. Blood samples were collected directly from the heart on day 42, and sera were separated as previously described and used for a mouse neutralization bioassay.

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Pelotas (Permit No. 9286). All efforts were made to minimize animal suffering.

Evaluation of the humoral immune response

The humoral immune responses of the mice and guinea pigs were evaluated by a mouse neutralization bioassay performed in accordance with the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply in its ministerial directive n.23 [28]. The results of the antibodies levels are expressed in international units per mL (IU/mL). Briefly, known amounts of native toxins were incubated for 60 min at 37 °C with different amounts of sera containing neutralizing antibodies. After the incubation period, two mice, weighing 18 to 22 g, were inoculated intravenously and observed for 72 h, with survival checked every 24 h.

Statistical analyses

Statistix 9 (Analytical Software) was used to perform ANOVA and Tukey's test to analyze antigenicity and establish significant differences in the ELISA results.

Results

Vector construction and the expression and purification of recombinant chimeras

The synthetic gene encoding for HC_cC and HC_cD (Fig. 1A), cloned by Epoch Biolabs Inc. (USA) into the pUC19 cloning vector, was digested with endonucleases to release a fragment encoding both chimeras together (Figs. 1B and 1C). These genes were cloned into either the pAE/*ltb* or pAE expression vectors, resulting in two different constructs: pAE/*ltb-hc_cc-hc_cd* and pAE/*hc_cc-hc_cd*. Digestion with endonucleases confirmed the correct cloning of each construct. Thereafter, BL21 (DE3) Star *E. coli* transformed with pAE/*ltb-hc_cc-hc_cd* or pAE/*hc_cc-hc_cd* expressed recombinant proteins of approximately 112 and 100 kDa, respectively, the expected molecular weights; however, additional bands with lower molecular weights than expected were also present (Figs. 2A and 2B). The additional bands are likely to be truncated proteins because they all reacted with anti-polyHistidine in a Western blot analysis (Fig. 2C). Both chimeras were obtained as inclusion bodies and were efficiently solubilized in lysis buffer containing 0.4% and 0.2% NLS, respectively. The

one-step refolding process using PBS with 0.05% Triton X-100 did not interfere with protein solubility, and precipitates and aggregates were not observed. Using this process, it was possible to achieve up to 100 mg of purified recombinant antigen per liter of culture.

Recombinant chimeras are recognized by standard sera

Recombinant chimeras were characterized with ELISAs using standard sera containing anti-BoNT serotypes C and D and anti-cholera toxin. The ELISAs showed positive reactions of anti-BoNT/C, anti-BoNT/D and anti-CT against rLTB/HC_CC/HC_CD. As expected, rHC_CC/HC_CD did not react only with anti-CT. Furthermore, the negative control (crude protein extract of BL21 (DE3) Star *E. coli*) did not react with any sera. Additionally, the standard sera anti-BoNT/C and anti-BoNT/D did not react with rLTB (Fig. 3). These results indicate that all domains of the recombinant chimeras are antigenic because they were recognized by standard sera and were significantly different from the negative controls ($p < 0.001$).

Recombinant chimeras are innocuous and elicit neutralizing antitoxins

Neither mice nor guinea pigs vaccinated with recombinant chimeras presented abnormal responses or lesions at their vaccination sites, indicating the safety of both

recombinant chimeras. Sera samples collected from vaccinated animals were used to evaluate the humoral immune responses. The mouse neutralization bioassay results from both mice and guinea pigs are presented in Table 2. In both experiments, rLTB/HC_CC/HC_CD plus Al(OH)₃ resulted in the best vaccination strategy. Pooled sera from the mice contained 2 IU/mL antibodies against both C and D toxins. Pooled sera from the guinea pigs contained 5 IU/mL and ≥ 10 IU/mL antibodies against toxins C and D, respectively. In mice, the other constructs elicited less than 2 and 1 IU/mL antibodies against C and D, respectively. Similarly, in guinea pigs, the other antigens elicited less than 1 IU/mL antibodies against both toxins. The commercial vaccine tested in mice was only effective against toxin C, whereas in guinea pigs, it elicited the expected antibody levels for both serotypes. The vaccination of guinea pigs with rLTB/HC_CC/HC_CD plus Al(OH)₃ met the requirements of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply in its ministerial directive No. 23 [28] and induced at least two times more D antitoxins than the commercial vaccine.

The formulations with only rLTB or Al(OH)₃ as single adjuvants induced low levels of neutralizing antibodies. In contrast, vaccination using both rLTB and Al(OH)₃ induced high levels of antitoxins. Clearly, there is a synergism between rLTB and Al(OH)₃, which is important for the induction of a stronger humoral immune response against the two analyzed BoNTs.

Discussion

Botulism in cattle has been the cause of great economic losses in the past years [5,7,8], with reports in other countries indicating that it is a potential source of food-borne botulism in humans [9,10]. This disease is therefore considered a widespread problem for both livestock production and human health. Currently, toxoids used to vaccinate animals are produced by *C. botulinum* fermentation and the further inactivation of produced toxins by formaldehyde. These procedures result in a non-predictable process that involves high biological risks because the native BoNTs are the most potent toxins known to humans [29]. Additionally, residual formaldehyde may affect the vaccine's safety [17]. The strategy utilized by our group overcomes these problems because heterologous protein expression in *E. coli* can be highly regulated, and the HC_C domain of the BoNTs is non-toxic, thus eliminating risks to workers during vaccine production.

We developed a bivalent recombinant vaccine with only one fermentative and downstream process, thereby facilitating vaccine production by avoiding additional fermentation steps. Most studies using *E. coli* to produce recombinant HC_C domains yield an average of 40 mg/L, except when a production optimization procedure is performed [30]. When only HC_CC and HC_CD production is considered, the yield

average is higher, reaching 70 mg/L-culture [13,18,31,32]. The expression strategy we employed was able to produce up to 100 mg of recombinant protein per liter of culture, indicating high expression efficiency. Thus, considering the previously reported expression yield for individual HC_Cs, our chimeras exhibit a more effective production system for vaccines, with only one bioprocess needed to produce what would normally require at least 4 different fermentation steps. An attempt to optimize the expression of rLTB/HC_CC/HC_CD using the same parameters as described by Yari et al. [33] in modified M9 medium did not interfere with the protein yield or the protein solubility (data not shown).

Our mouse and guinea pig vaccination results demonstrated that both fused constructs did not cause adverse side effects and are capable of inducing neutralizing antibodies (Table 2). These results were expected because the HC_C domains of BoNTs are non-toxic and capable of inducing protection against botulism [18]. Although the fusion of HC_CC, HC_CD and LTB might eliminate a few important protective epitopes, the immune responses of the mice and guinea pigs suggest that some epitopes were still present, thereby allowing the generation of immunity to botulism. Although a linker consisting on 3xGly was added between rHC_CC and rHC_CD, it is possible that the conformational epitopes of rHC_CC could not fold properly when compared to rHC_CD, which is flanked only by rHC_CC. This is possible because HC_CD elicited higher neutralization titers than HCC_C in guinea pigs. Three

glycine residues were chosen because this amino acid has no side chain and thus confers flexibility between the domains, allowing the correct protein folding of each one. In fact, previous studies have described the effective use of glycine-rich linkers, such as $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ and $(\text{Gly-Ser-Gly})_2$, even in vaccine studies due to the flexibility of glycine [34–39]. These linkers are larger than the 3xGly used in this work, supporting the hypothesis that it is too short to allow the proper folding of $\text{HC}_\text{C}\text{C}$, and thus explaining the difference in the production of antibodies against toxins C and D in guinea pigs. Sakamoto et al. [38] described the influence of linker length and flexibility upon functionality of each domain of a recombinant chimera. Thus, it is possible that using a $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ linker instead of only 3xGly may result in a stronger humoral immune response.

Despite a different vaccination schedule, a remarkable discrepancy was observed between the results of the two animal models. While the chimeric vaccine induced high neutralizing antibodies levels in guinea pigs, the mice did not show a similar result. Although neutralization assays are not commonly performed with mouse sera, our data are not in accordance with the literature, as previous studies have shown that BALB/c and ICR mice can generate high levels of protection against several BoNTs [18,40]. One possible explanation for these experimental differences is the mouse strain that we used (Swiss Webster). This type of mouse is genetically heterogeneous and thus has the advantage of representing a varied population. In

addition, it is not an enhanced T_H2 responder strain, such as the BALB/c strain, which could explain the low antibody production against the antigens that were used. In contrast, guinea pigs are ideal model organisms for immunology tests against botulism and, thus, it is expected that high levels of immunological responses could be generated [41,42].

Both chimeras induced high levels of neutralizing antibodies against both serotypes in guinea pigs. It is noteworthy that the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply determined that a vaccine against bovine botulism must induce minimum of 5 IU/mL and 2 IU/mL of anti-BoNT C and D neutralizing antibodies, respectively, to be approved [28]. In our results from the mouse neutralization bioassay, the chimera rLTB/HCC_C/HCC_D plus Al(OH)₃ induced 5 IU/mL and ≥ 10 IU/mL for serotypes C and D, respectively, which is in accordance with the government's mandate. These values were comparable to the commercial vaccine and much higher than the other tested constructs. Takeda et al. [43] vaccinated ducks with a C/D mosaic toxoid (the HCC portion consisted of serotype D) and obtained an average of 6 IU/mL, as determined by the mouse neutralization bioassay. Moreover, in our study, sera samples were obtained from guinea pigs three weeks after the last vaccination dose, in a manner similar to that of Takeda [43]. Nonetheless, we obtained an average of 7.5 IU/mL when considering both serotypes, which highlights the potential of our chimera. However, guinea pigs vaccinated with

rLTB/HC_CC/HC_CD alone and rHC_CC/HC_CD plus Al(OH)₃ did not display an appropriate humoral immune response.

The best results were obtained using the constructs containing LTB, a powerful adjuvant of humoral immune response [18-21]. LTB was essential for the development of a strong humoral immune response when it acted in synergism with Al(OH)₃. Thus far, there have not been any works reporting a bivalent vaccine against botulism using a single polypeptide chain containing antigens and adjuvant. Additionally, there have not been any works evaluating LTB as an adjuvant in vaccines for preventing botulism. Conceição et al. [22] used LTB fused to the R1 antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin to immunize mice without conventional adjuvants. This treatment induced the production of strong humoral and cellular immune responses, highlighting the use of LTB as an adjuvant of the immune response with antigens fused to its C-terminal portion. Indeed, the fusion of other antigens to the C-terminal end of LTB does not impair its biological activity, as was already reported [22,41,42].

Zeng et al. [46] published a similar work with a trivalent recombinant chimera against *C. perfringens* toxins, in which vaccines with fused toxins or co-administered antigens were demonstrated to have higher immunogenicity than antigens alone, eliciting a high titer of neutralizing antibodies. These results corroborate ours, in

which synergism between LTB and $\text{Al}(\text{OH})_3$, together with vaccination with fused antigens, induced elevated titers of neutralizing antibodies. The large difference between the levels of neutralizing antibodies generated by vaccination of guinea pigs with $\text{Al}(\text{OH})_3$ and either rLTB/ $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ or r $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ support these findings and indicate that LTB indeed works as a systemic humoral immune response adjuvant, even though it was originally described to be a mucosal adjuvant [47]. Additionally, animals vaccinated with rLTB/ $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ without conventional adjuvant developed low levels of neutralizing antibodies, suggesting that synergism between $\text{Al}(\text{OH})_3$ and LTB is essential for the induction of an appropriate humoral immune response.

Both LTB and $\text{Al}(\text{OH})_3$ are capable of inducing $\text{T}_\text{H}2$ -type responses [26,48], which in turn activate B cells through secretion of IL-4 and IL-5 [49], resulting in B cell proliferation and a strong humoral response consisting of the production of both s-IgA and IgG [50], as well as other isotypes. Aluminum hydroxide also creates a deposit of antigens, which extends the antigen exposure time to the immune cells, resulting in a stronger and more specific systemic response. Although the mechanism of action of LTB remains unclear, it has been shown that its activity stems from its ability to bind to GM1 ganglioside receptors [26,47,51], which are present on almost all mammalian cells, including antigen-presenting cells [51]. In this manner, LTB plays a key role by easing antigen uptake and presentation by dendritic cells, macrophages and, most importantly, B cells [51]. Furthermore, LTB has been shown to up-regulate the

expression of essential molecules for the development of an appropriate and strong immune response, such as the B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules. It also augments the expression of chemokine receptors and MHC class II on antigen-presenting cells [52]. Consequently, the adjuvant effects induced by both LTB and $\text{Al}(\text{OH})_3$ act synergistically and complement each other, resulting in a stronger systemic humoral response. Thus, the rLTB/ $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ molecule can be considered a “3 in 1” product, as it contains (1) a vaccine against cattle botulism serotype C, (2) a vaccine against cattle botulism serotype D, and (3) an adjuvant molecule, all in a single polypeptide chain.

In conclusion, we describe in this study the potential of the recombinant chimera rLTB/ $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ as a novel strategy to prevent botulism in cattle by vaccination. The use of rLTB/ $\text{HC}_C\text{C}/\text{HC}_C\text{D}$ plus $\text{Al}(\text{OH})_3$ could be considered a potential commercial product, although large-scale production must still be established. We also corroborated the results from other studies [22, 25] establishing the potential of LTB as a humoral immune response adjuvant. Furthermore, our study also provides insights for studies with respect to other bacterial toxins.

Tables

Table 1. Specifications regarding restriction enzymes, gene fragments and chimera characteristics.

Recombinant chimera	Restriction enzymes ^a	Expression vector	Insert	Fragment length (pb)	Molecular mass (kDa) ^b
rLTB/HC _C C/HC _C D	<i>Xho</i> I and <i>Hind</i> III	pAE/ <i>l</i> tb	<i>hc_Cc/hc_Cd</i>	2562	112.4
rHC _C C/HC _C D	<i>Kpn</i> I and <i>Hind</i> III	pAE	<i>hc_Cc/hc_Cd</i>	2568	100.0

^a Purchased from New England Biolabs

^b Predicted by Vector NTI Advance 11 (Invitrogen)

Table 2. Levels of neutralizing antibodies against BoNT serotypes C and D in vaccinated mice and guinea pigs.

Vaccine formulation	Mice ^a		Guinea pigs ^a	
	Serotype C	Serotype D	Serotype C	Serotype D
rLTB/HC _C C/HC _C D	2 IU/mL	1 IU/mL	≤ 1 IU/mL	≤ 1 IU/mL
rLTB/HC _C C/HC _C D + Al(OH) ₃	2 IU/mL	2 IU/mL	5 IU/mL	≥ 10 IU/mL
rHC _C C/HC _C D + Al(OH) ₃	2 IU/mL	1 IU/mL	≤ 1 IU/mL	≤ 1 IU/mL
Commercial vaccine	5 IU/mL	1 IU/mL	5-10 IU/mL	2-5 IU/mL
PBS	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a Values obtained by mouse neutralization assay.

^b ND, not detectable.

Figures and Figure Legends

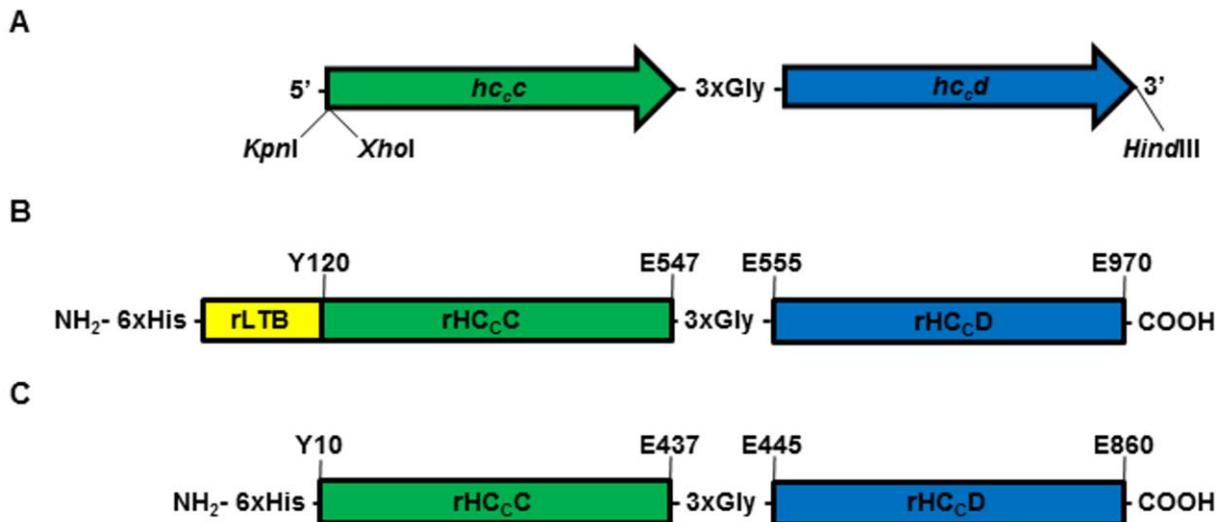


Figure 1 Schematic representation of the constructed gene and fusion proteins. (A) Structure of the gene designed to encode the fusion antigens. The *hc_c* (green) is flanked by *KpnI* and *XhoI* sites, respectively, at the 5' end. The coding sequence of *hc_d* (blue) is linked at the 3' end of *hc_c* by three Glycine codons and is flanked by *HindIII* at the 3' end. (B) Representation of the recombinant chimera rLTB/rHC_C/rHC_D. The resulting protein has a six-Histidine tag at the N-terminal region, followed by the adjuvant rLTB connected to rHC_C, a three-Glycine linker (3xGly) and the rHC_D at the C-terminal region. (C) Representation of the recombinant chimera rHC_C/rHC_D. The resulting protein has the same characteristics as shown in B, except for the absence of the rLTB sequence connected to the N-terminal region of HC_C.

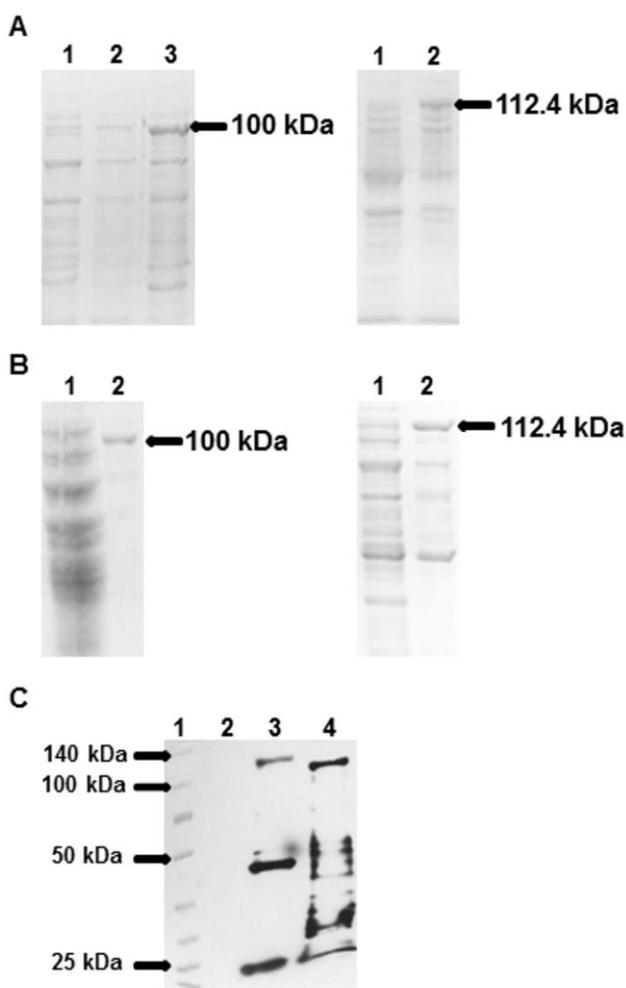


Figure 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of protein expression and purification.

(A) SDS-PAGE of the whole *E. coli* cell extract after 3 h of induction of both constructs. Left, 1: Untransformed BL21 (DE3) Star *E. coli*; 2: BL21 (DE3) Star *E. coli* transformed with pAE/*hc_cc-hc_cd* before induction; 3: *E. coli* BL21 (DE3) Star transformed with pAE/*hc_cc-hc_cd* after induction. Right, 1: Untransformed BL21 (DE3) Star *E. coli*; 2: BL21 (DE3) Star *E. coli* transformed with pAE/*ltb-hc_cc-hc_cd* before induction; 3: BL21 (DE3) Star *E. coli* transformed with pAE/*ltb-hc_cc-hc_cd* after induction. (B) SDS-PAGE to evaluate the purity and integrity of purified proteins after Ni-affinity chromatography. Left, rHC_CC. Right, rHC_CD. All lanes

designated “1” are untransformed BL21 (DE3) Star *E. coli*, and the lanes designated “2” are the purified antigens. (C) Anti-his Western blot to characterize the purified proteins. 1: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific), 2: Untransformed BL21 (DE3) Star *E. coli*, 3: rLTB/HC_CC/HC_CD, 4: rHC_CC/HC_CD.

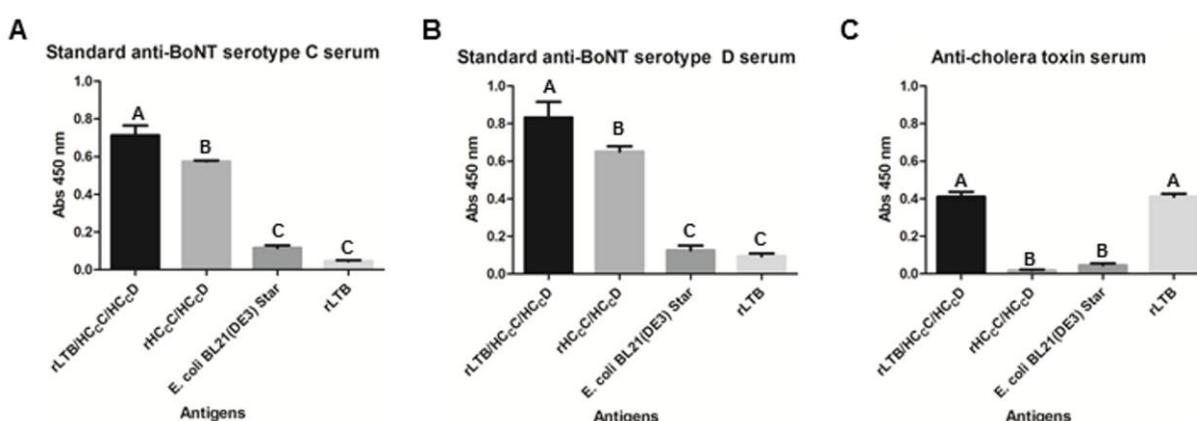


Figure 3 Antigenicity evaluation of the recombinant chimeras by ELISA using standard anti-BoNT C and D sera. Anti-BoNT C serum (A) showed that the rLTB/HC_CC/HC_CD antigen has more antigenic epitopes than rHC_CC/HC_CD, while anti-BoNT D serum (B) shows no difference between these two antigens. Anti-cholera toxin serum (C) was used to evaluate the antigenicity of the rLTB domain. Crude protein extract from BL21 (DE3) Star *E. coli* and purified rLTB were used as controls for the specificity of the three sera. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) according to Tukey's test.

REFERÊNCIAS

1. Smith LA: **Botulism and vaccines for its prevention.** *Vaccine* 2009, **27**:D33-9.
2. Simpson LL: **Identification of the major steps in botulinum toxin action.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2004, **44**:167-93.

3. Costa GMD, Salvador SC, Pereira MN: **Botulismo em bovinos leiteiros no Sul de Minas Gerais, Brasil.** *Ciência Rural* 2008, **38**:2068-2071.
4. Dutra IS, Dobereiner J, Rosa IV, Souza LAA, Nonato M: **Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2001, **21**:43-48.
5. Dutra IS, Döbereiner J, M SA: **Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2005, **25**:115-119.
6. Payne JH, Hogg RA, Otter A, Roest HI, Livesey CT: **Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter.** *Veterinary Record* 2011, **168**:640.
7. Böhnelt H, Neufeld B, Gessler F: **Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism.** *Veterinary journal* 2005, **169**:124-5.
8. Livesey CT, Sharpe RT, Hogg RA: **Recent association of cattle botulism with poultry litter.** *Veterinary Record* 2004, **154**:734-5.
9. Steinman a, Galon N, Arazi a, Bar-Giora Y, Shpigel NY: **Cattle immune response to botulinum type D toxoid: results of a vaccination study.** *Vaccine* 2007, **25**:7636-40.
10. Lee J-C, Hwang H-J, Sakaguchi Y, Yamamoto Y, Arimitsu H, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Tsuchiya T, Oguma K: **C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine.** *Microbiology and immunology* 2007, **51**:445-55.
11. Mansour AA, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, et al: **Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal**

heavy chain of C. botulinum neurotoxin type E. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2010, **38**:260–264.

12. Hakami RM, Ruthel G, Stahl AM, Bavari S: **Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin.** *Trends in microbiology* 2010, **18**:164-72.

13. Turton K, Chaddock J a, Acharya KR: **Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility.** *Trends in biochemical sciences* 2002, **27**:552-8.

14. Ravichandran E, Al-Saleem FH, Ancharski DM, Elias MD, Singh AK, Shamim M, Gong Y, Simpson LL: **Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route.** *Infection and immunity* 2007, **75**:3043-54.

15. Byrne MP, Smith L a: **Development of vaccines for prevention of botulism.** *Biochimie* 2000, **82**:955-66.

16. Baldwin MR, Tepp WH, Przedpelski A, Pier CL, Bradshaw M, Johnson E a, Barbieri JT: **Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism.** *Infection and immunity* 2008, **76**:1314-8.

17. Dux MP, Huang J, Barent R, Inan M, Swanson ST, Sinha J, Ross JT, Smith L a, Smith TJ, Henderson I, Meagher MM: **Purification of a recombinant heavy chain fragment C vaccine candidate against botulinum serotype C neurotoxin [rBoNTC(H(c))] expressed in Pichia pastoris.** *Protein expression and purification* 2011, **75**:177-85.

18. Henkel JS, Tepp WH, Przedpelski A, Fritz RB, Johnson E a, Barbieri JT: **Subunit vaccine efficacy against Botulinum neurotoxin subtypes.** *Vaccine* 2011, **29**:7688-95.

19. Webb RP, Smith TJ, Wright PM, Montgomery V a, Meagher MM, Smith L a: **Protection with recombinant Clostridium botulinum C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins.** *Vaccine* 2007, **25**:4273-82.
20. Conceição FR, Moreira AN, Dellagostin OA: **A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice.** *Vaccine* 2006, **24**:5734-43.
21. Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Moraes CM, Ferreira LN, Vilela CO, Caetano CF, Vargas GD, Hubner SO, Vidor T, Roche PM: **Recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010, **26**:489-495.
22. da Hora VP, Conceição FR, Dellagostin O a, Doolan DL: **Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants.** *Vaccine* 2011, **29**:1538-44.
23. Grassmann AA, Félix SR, dos Santos CX, Amaral MG, Seixas Neto ACP, Fagundes MQ, Seixas FK, da Silva EF, Conceição FR, Dellagostin OA: **Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin.** *Clinical and vaccine immunology* 2012, **19**:740-5.
24. Sambrook J, Russel DW: **Molecular cloning.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 2001.
25. Brasil. Ministério da Agricultura. **Instrução normativa n. 23.** Brasília: Diário Oficial da União; 18 de março de 2002
26. Yari K, Fatemi SS-A, Tavallaei M: **High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of Escherichia coli.** *Bioprocess and biosystems engineering* 2012, **35**:407-14.

27. Woodward LA, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K: **Expression of HC subunits from Clostridium botulinum types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice.** *Infection and immunity* 2003, **71**:2941-4.
28. Arimitsu H, Lee J-C, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin S-N, Mukamoto M, Murphy T, Oguma K: **Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of Clostridium botulinum Type C and D neurotoxins.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2004, **11**:496-502.
29. Yari K, Fatemi SS-A, Tavallaei M, Tavallaei M: **Optimization of the BoNT/A-Hc expression in recombinant Escherichia coli using the Taguchi statistical method.** *Biotechnology and applied biochemistry* 2010, **56**:35-42.
30. Bie C-Q, Yang D-H, Liang X-J, Tang S-H: **Construction of non-covalent single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma and their biological functions.** *World journal of hepatology* 2010, **2**:185-91.
31. Menezes M a, Aires K a, Ozaki CY, Ruiz RM, Pereira MC, Abreu PA, Elias WP, Ramos OH, Piazza RM: **Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv).** *BMC research notes* 2011, **4**:30.
32. Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Nakamura S, Sasaki-Tabata K, Tanizaki Y, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S: **Construction, expression, and characterization of a single-chain variable fragment antibody against 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the hemolymph of silkworm larvae.** *Applied biochemistry and biotechnology* 2011, **164**:715-28.
33. Skrlj N, Vranac T, Popović M, Curin Šerbec V, Dolinar M: **Specific binding of the pathogenic prion isoform: development and characterization of a humanized single-chain variable antibody fragment.** *PloS one* 2011, **6**:e15783.
34. Sakamoto S, Tanizaki Y, Pongkitwitoon B, Tanaka H, Morimoto S: **A chimera of green fluorescent protein with single chain variable fragment antibody against**

ginsenosides for fluorescence-linked immunosorbent assay. *Protein expression and purification* 2011, **77**:124-30.

35. Dang Z, Feng J, Yagi K, Sugimoto C, Li W, Oku Y: **Mucosal Adjuvanticity of Fibronectin-Binding Peptide (FBP) Fused with Echinococcus multilocularis Tetraspanin 3: Systemic and Local Antibody Responses.** *PLoS neglected tropical diseases* 2012, **6**:e1842.

36. Yu Y-Z, Li N, Zhu H-Q, Wang R-L, Du Y, Wang S, Yu W-Y, Sun Z-W: **The recombinant Hc subunit of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate.** *Vaccine* 2009, **27**:2816-22.

37. Gelzleichter TR, Myers MA, Menton RG, Niemuth NA, Matthews MC, Langford MJ: **Protection against botulinum toxins provided by passive immunization with botulinum human immune globulin: evaluation using an inhalation model.** *Journal of applied toxicology : JAT* 1999, **19 Suppl 1**:S35-8.

38. Shone C, Agostini H, Clancy J, Gu M, Yang H-H, Chu Y, Johnson V, Taal M, McGlashan J, Brehm J, Tong X: **Bivalent recombinant vaccine for botulinum neurotoxin types A and B based on a polypeptide comprising their effector and translocation domains that is protective against the predominant A and B subtypes.** *Infection and immunity* 2009, **77**:2795-801.

39. Takeda M, Kasai H, Torii Y, Mukamoto M, Kohda T, Tsukamoto K, Kozaki S: **Protective effect of botulinum C/D mosaic toxoid against avian botulism.** *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2006, **68**:325-30.

40. Liljeqvist S, Ståhl S, Andréoni C, Binz H, Uhlén M, Murby M: **Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding.** *Journal of immunological methods* 1997, **210**:125-35.

41. Arakawa T, Yu J, Chong DKX, Hough J, Engen PC, Langridge WHR: **A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes.** *Nature Biotechnology* 1998, **16**:934-938.
42. Zeng J, Deng G, Wang J, Zhou J, Liu X, Xie Q, Wang Y: **Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows.** *Vaccine* 2011, **29**:5459-66.
43. Freytag LC, Clements JD: **Mucosal adjuvants.** *Vaccine* 2005, **23**:1804-13.
44. Hunter RL: **Overview of vaccine adjuvants: present and future.** *Vaccine* 2002, **20 Suppl 3**:S7-12.
45. Hubbell J a, Thomas SN, Swartz M a: **Materials engineering for immunomodulation.** *Nature* 2009, **462**:449-60.
46. Petrovska L, Lopes L, Simmons CP, Pizza M, Dougan G, Chain BM: **Modulation of dendritic cell endocytosis and antigen processing pathways by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and mutant derivatives.** *Vaccine* 2003, **21**:1445-54.
47. Sanchez J, Holmgren J: **Cholera toxin - a foe & a friend.** *The Indian journal of medical research* 2011, **133**:153-63.
48. George-chandy A, Eriksson K, Lebens M, Nordström I, Schön E, Holmgren J, Scho E: **Cholera Toxin B Subunit as a Carrier Molecule Promotes Antigen Presentation and Increases CD40 and CD86 Expression on Antigen-Presenting Cells Cholera Toxin B Subunit as a Carrier Molecule Promotes Antigen Presentation and Increases CD40 and CD86 Expressi.** *Infection and immunity* 2001, **69**:5716-5725.

ANEXO B

VACINAÇÃO DE PORCAS COM TOXÓIDE RECOMBINANTE BIVALENTE DE
Clostridium perfringens

Formatado conforme as normas do congresso VI Simpósio de Microbiologia
Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada

VACINAÇÃO DE PORCAS COM TOXÓIDE RECOMBINANTE BIVALENTE DE

Clostridium perfringens

INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é um bacilo anaeróbio formador de esporos presente, de forma saprófita, no trato gastrointestinal de animais e humanos e classificado em cinco tipos de acordo a produção de quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota [1]. *C. perfringens* tipo A, produtor das toxinas alfa, beta-2 e enterotoxina, tem sido implicado como causa de doenças entéricas, principalmente a diarreia em leitões, principalmente até os primeiros quatro dias de vida [2]. *C. perfringens* tipo C, produtor das toxinas alfa, beta, beta-2 e enterotoxina, pode acometer leitões ainda mais precocemente e de forma mais grave, causando enterite necrótica hemorrágica [3].

A toxina alfa, produzida por todos os tipos, é uma fosfolipase C que age na fosfatidilcolina e em menor grau na esfingomielina [4]. A ação desta toxina resulta em hemólise, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações no metabolismo, culminando em morte celular [5]. Já toxina beta, produzida pelos tipos B e C, exerce efeito citotóxico por meio da formação de poros na membrana plasmática [6].

A suinocultura é responsável, segundo estimativas, pela renda de 2,7 milhões de pessoas no Brasil. Diarreia causada por *C. perfringens* tipos A e C representa significativo aumento na mortalidade, piora na conversão alimentar e no ganho de peso, além de gastos excessivos com medicamentos, de forma a gerar grandes prejuízos aos suinocultores. O uso de antibióticos como medida preventiva não é

adequado por selecionar cepas resistentes e, portanto, são necessárias novas estratégias para o controle. A vacinação de porcas no pré-parto objetivando transferir imunidade passiva aos leitões via colostro é o meio ideal para prevenção de clostridioses entéricas [7]. Entretanto, há somente duas vacinas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ambas se restringem ao toxóide beta de *C. perfringens* tipo C.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imunidade ativa e passiva geradas pelas toxinas recombinantes alfa e beta de *C. perfringens* tipos A e C em porcas gestantes e leitões, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção das toxinas recombinantes

As toxinas alfa e beta recombinantes foram produzidas conforme já descrito [8, 9]. Ambas as toxinas recombinantes não possuem atividade tóxica, não sendo, portanto, necessária a etapa de detoxificação com formalina.

Formulação das vacinas

As toxinas recombinantes alfa e beta foram misturadas com hidróxido de alumínio, na concentração final de 2,83% de óxido de alumínio livre, na proporção de 1:2, sob agitação a 4°C durante a noite, como adjuvante. Foram utilizados 200 µg de cada antígeno por dose.

Testes de esterilidade e inocuidade

A esterilidade foi verificada pela inoculação de 0,5 mL da vacina em quatro tubos contendo 20 mL de caldo tioglicolato e em quatro tubos contendo 20 mL de

caldo Sabouraud. Metade dos tubos de cada meio de cultura foi incubada em anaerobiose. Todos os tubos inoculados foram mantidos a 37°C, por 21 dias, com leituras diárias [10].

Para avaliação da inocuidade, duas marrãs foram inoculadas com o dobro do volume e concentração antigênica da dose teste via subcutânea. Os animais foram observados por sete dias, quanto à produção de reações locais e sistêmicas significativas [11].

Vacinação dos animais

Sete porcas foram inoculadas com 200 µg de cada toxina recombinante, em um volume final de 5 mL, aos 80 e 100 dias de gestação via subcutânea. Uma porca (controle negativo) recebeu duas doses contendo 5 mL de solução salina estéril.

A utilização de animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo nº 102/10.

Avaliação da resposta imune humoral

A coleta de sangue das porcas foi feita no dia do parto, por punção da veia jugular. Nos leitões, o sangue foi coletado 24 horas após o nascimento, por punção da veia cefálica. Os soros foram devidamente acondicionados, identificados e armazenados em freezer a -20°C até a realização dos testes.

As amostras dos soros das porcas e *pools* de soros de leitões foram titulados pelos métodos de soroneutralização em camundongos para titulação da antitoxina beta [11] e alfa [12]. O título de neutralização de cada soro foi calculado e expresso em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) [13].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As toxinas recombinantes foram expressas e purificadas conforme já descrito [8, 9]. A pureza das toxinas recombinantes foi avaliada mediante eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Fig. 1). Pode-se observar que as proteínas apresentam pureza suficiente para serem utilizadas como vacinas veterinárias.

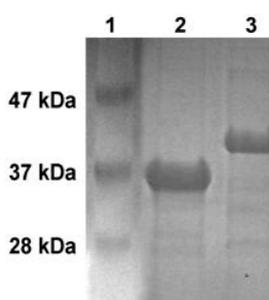


Figura 1: Gel de poliacrilamida 12% com SDS mostrando as toxinas recombinantes purificadas. 1: BioPioneer Low range pre-stained Protein Marker; 2: toxina beta recombinante; 3: toxina alfa recombinante.

No resultado do teste de esterilidade não foi observado o crescimento em nenhum tubo de cultura até os 21 dias preconizados e nem reações adversas ou negativas no teste de inocuidade, indicando a segurança da vacina.

Após a coleta de soro dos animais, foi realizada a titulação dos mesmos por meio da técnica de soroneutralização em camundongos. Foram encontrados títulos nas porcas de 5,6 UI/mL e 14,5 UI/mL, em média, para as antitoxinas alfa e beta, respectivamente, cujos valores estão representados na Tabela 1. Em relação à antitoxina alfa, já foram descritos títulos de 24 UI/mL [14], entretanto a vacina utilizada era monovalente e a quantidade de antígeno por dose não foi informada, impossibilitando um comparativo válido. Já para a antitoxina beta, o valor médio dos títulos foi quase três vezes superior aos previamente relatados [15], porém não

foram descritos maiores detalhes, não permitindo traçar paralelos entre os dois trabalhos.

Tabela 1: Níveis de antitoxinas alfa e beta em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) no soro de porcas imunizadas.

	Antitoxina alfa	Antitoxina beta
Porca 1	6,9 UI/mL	17,3 UI/mL
Porca 2	4,8 UI/mL	12 UI/mL
Porca 3	4,8 UI/mL	12 UI/mL
Porca 4	5,7 UI/mL	14,4 UI/mL
Porca 5	6,9 UI/mL	17,3 UI/mL
Porca 6	5,7 UI/mL	14,4 UI/mL
Porca 7	6,9 UI/mL	14,4 UI/mL
Porca 8 (controle negativo)	ND	ND

ND = não detectável

Os títulos de antitoxinas alfa e beta nos *pools* de soros das leitegadas das porcas imunizadas estão representados na Tabela 2. A antitoxina alfa apresentou uma média de 4,2 UI/mL nos *pools* de soros, valor também inferior aos resultados previamente publicados [14], porém não é possível traçar uma comparação, por motivos já esclarecidos. Já para a toxina beta, a média de títulos nos *pools* de soros foi de 10,8 UI/mL. Em contraste com os níveis de antitoxina beta gerados pelas vacinações nas porcas, os níveis foram, desta vez, inferiores aos previamente relatados [15], entretanto a variação entre grupos encontrada no presente trabalho foi muito menor, indicando a importância do parto assistido e do colostro na indução de imunidade passiva aos leitões.

Tabela 2: Níveis de antitoxinas alfa e beta em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) nos *pools* de soros das leitegadas das porcas imunizadas.

	Antitoxina alfa	Antitoxina beta
Leitegada 1	4 UI/mL	12 UI/mL
Leitegada 2	4 UI/mL	10 UI/mL
Leitegada 3	4 UI/mL	10 UI/mL
Leitegada 4	4 UI/mL	12 UI/mL
Leitegada 5	4,8 UI/mL	12 UI/mL
Leitegada 6	4 UI/mL	10 UI/mL
Leitegada 7	4,8 UI/mL	10 UI/mL
Leitegada 8 (controle)	ND	ND

ND = não detectável

Embora legislações [10, 12] determinem coelhos como modelo animal para determinação da potência de vacinas contra toxinas alfa e beta de *C. perfringens*, todos os leitões e porcas apresentaram resultado de titulação de ambas antitoxinas superior ao limite mínimo de 4 UI/mL para a antitoxina alfa e de 10 UI/mL para a antitoxina beta, destacando o potencial comercial da vacina desenvolvida. Resultados semelhantes foram obtidos em coelhos (dados não publicados).

CONCLUSÕES

A partir destes resultados pode-se concluir que a vacinação experimental com as toxinas alfa e beta recombinantes de *C. perfringens* tipos A e C foi eficiente, atingindo os limites mínimos determinados pelo MAPA e podendo vir a ser um meio de prevenção contra diarreia neonatal em suínos.

REFERÊNCIAS

- [1] Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA. Clostridium Perfringens Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. The Open Toxinology Journal 2010;3:24-42.
- [2] Yaeger MY. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. 38th ANNUAL MEETING AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIAN 2007;38:101-103.
- [3] Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2005;17:528-536.
- [4] Titball RW, Naylor CE, Basak AK. The Clostridium perfringens α -toxin. Anaerobe 1999;2:51-64.

[5] Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiology* 2009;8:1021-1064.

[6] Uzal FA, McClane BA. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Veterinary microbiology* 2011;153:37-43.

[7] Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology* 2004;100:255-268.

[8] de los Santos, JRG. Construction and evaluation of *Clostridium perfringens* A recombinant a toxin vaccines. Doctor of Sciences Thesis, Universidade Federal de Pelotas, Brazil 2007.

[9] Milach A, de los Santos JRG, Turnes CG, Moreira AN, Assis RA, Salvarani FM, Lobato FCF, Conceição FR. Production and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant β toxoid. *Anaerobe* 2012;3:363-5.

[10] Brasil Ministério da Agricultura. Portaria n. 49 de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o carbúnculo sintomático, gangrena gasosa, enterotoxemia e tétano. *Diário Oficial da União, Brasília, 1997;1:10168-10169.*

[11] European Pharmacopoeia. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S. A. 1998.

[12] Conditional Licenses for Products Containing *Clostridium perfringens* Type A. United States Department Of Agriculture. Center for Veterinary Biologics Notice N^o 20-25/2002.

[13] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene* 1938;27:493-497.

[14] Hammer JM, Fuhrman M, Walz M. Serological evaluation of *Clostridium perfringens* type A toxoid in a commercial swine herd. *Journal of Swine Health and Production* 2008;16:3740.

[15] Matischeck PH, McGinley M. Colostral transfer of *Clostridium perfringens* type C beta antitoxin in swine. *American Journal of Veterinary Research* 1986;47:1132-1133.