

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



Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos

Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira

Pelotas, 2013

Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira

Caracterização de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos

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, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência e Tecnologia - UFPel

M838c Moreira, Gustavo Marçal Schmidt Garcia
 Caracterização de proteínas recombinantes e anticorpos
 monoclonais para o desenvolvimento de vacinas e testes
 diagnósticos / Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira. –
 88f. : fig. – 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. Listeriose. 3. Vacinas recombinantes.
4. Imunodiagnóstico. 5. Campilobacteriose vnérea bovina. 6..
Clostridium septicum. 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

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

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

“Dedico este trabalho de conclusão de curso a Deus, à minha família e à pesquisa. Sem eles, não teria o privilégio de existir nem de contribuir para o progresso científico.”

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, por oferecer um curso de graduação de alto nível, do qual tenho orgulho de ter participado.

Ao meu orientador, Fabricio Rochedo Conceição, por ter compartilhado seus conhecimentos, sempre acreditando em mim e dando aporte para minha formação.

À professora Ângela Nunes Moreira, pelo auxílio na orientação e por ter confiado em mim durante realização das pesquisas, juntamente com meu orientador.

Ao meu orientador de estágio Marcelo Mendonça, por ter me concedido a oportunidade de participar de seus projetos, pelos ensinamentos e pelo incentivo, os quais contribuíram enormemente para minha formação.

Ao professor e co-orientador Luciano da Silva Pinto, agora coordenador do curso, pela oportunidade de participar e de ser bolsista de seus projetos, pelos ensinamentos, incentivo, confiança e cobrança, sempre de forma amigável.

Aos meus pais, Félix e Sirlei, sem os quais não conseguiria chegar até aqui, pois sempre fizeram de tudo para meu bem-estar e me apoiaram de forma incondicional para que eu conseguisse terminar minhas tarefas durante a faculdade.

À minha namorada Évelyn Signor Debastiani, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, apoio e amizade durante os momentos mais conturbados da graduação, bem como pelos ótimos e agradáveis momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos Arthur, Eduardo, Gabriel, Rafael, Mohammad, Alessandra e Camilla, pela proporção de momentos divertidos e conversas agradáveis que aliviaram o estresse durante minha graduação.

Aos colegas do laboratório de Imunologia Aplicada Caroline, Rodrigo, Clóvis, Marcelle, Neida, Leonardo, Diego, Vanessa, Gabriela, Louise, Suely, Giana, Luiza, Stéfani e Carlos Eduardo, pela ajuda, palavras de incentivo e convívio agradável. Em especial ao Carlos Eduardo, pela dinâmica colaboração para o bem da biologia molecular do laboratório.

Ao Gabriel e Juliano, pela amizade, ensinamentos, auxílio e paciência durante o início de minha experiência laboratorial.

À FAPERGS e ao CNPq, pela concessão das bolsas de Iniciação Científica.

Muito obrigado!

Resumo

MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia. **Caracterização de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos**. 2013. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O primeiro projeto abordou o desenvolvimento de uma vacina contra a gangrena gasosa causada pela bactéria *Clostridium septicum*. Essa bactéria é uma das principais causadoras da doença em rebanhos brasileiros. Dentre as toxinas produzidas por esse patógeno, a toxina alfa de *C. septicum* (TACS) é fundamental para sua virulência. Assim como para outras clostridioses, a conduta mais eficaz e viável para o controle dessa doença é a vacinação. Contudo, as vacinas disponíveis no mercado envolvem um perigoso processo de produção, com rendimento imprevisível. Além disso, não existe controle sobre essas vacinas, o que explica os baixos níveis de proteção nos animais vacinados. No presente trabalho, a TACS foi produzida em *Escherichia coli*. A proteína foi obtida em forma de corpos de inclusão (CI), os quais foram purificados, resultando no rendimento de aproximadamente 30mg/L de cultivo. Ainda, foram preparadas suspensões de CI e de bacterinas expressando rTACS. Esses três componentes vacinais serão posteriormente testados em modelos animais quanto sua efetividade de proteção. O segundo projeto envolveu o desenvolvimento de testes diagnósticos para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* (Lm). Lm é uma bactéria patogênica de origem alimentar, sendo a principal espécie causadora da listeriose em humanos e animais. Devido à ubiquidade e à alta resistência em condições adversas, Lm é encontrada em diversos alimentos. O método tradicional de detecção desse patógeno, feito através de enriquecimentos e cultivos bacterianos, possui custo elevado e exige longo período até o resultado final. Assim, métodos imunológicos servem de alternativa para diminuir o tempo e o custo. Nesse trabalho, os anticorpos monoclonais (MAbs) 3F8 (anti-*Listeria* spp.), 3B7 e 2D12 (ambos anti-Lm), previamente produzidos no Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec, UFPel), foram avaliados em ELISA direto e sanduíche. No ELISA direto, os three MAbs conjugados com peroxidase mantiveram sua capacidade de distinção. No ELISA sanduíche, a melhor quantidade para captura foi determinada em 0,5µg por poço, para 3F8, e 1µg por poço, para 3B7 e 2D12. A proteína frutose 1,6-bisfosfato aldolase (FBA) foi determinada como o alvo de 3F8. Esse alvo foi produzido em *E. coli*, sendo obtido solúvel ou solubilizado com N-lauroilsarcosine, e utilizado como imunógeno para a produção hibridomas. A análise de frações proteicas de Lm – também utilizadas como imunógenos – indicou que FBA é presente na parede celular, membrana e citoplasma, bem como é expressa em diferentes níveis durante o crescimento da bactéria. O último projeto tratou de uma parceria com o Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Medicina Veterinária (UFSM). Neste, uma nova proteína, denominada rSapAn78, foi desenhada para servir como componente vacinal ou diagnóstico do patógeno *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Além da expressão dessa proteína, outros dois genes, relativos às subunidades individuais de rSapAn78, foram subclonados em vetor pAE para expressão em *E. coli*. Essas três proteínas serão futuramente testadas quanto sua aplicabilidade, mantendo a parceria entre os laboratórios envolvidos na pesquisa.

Palavras-chave: *Clostridium septicum*. Vacina recombinante. Listeriose. Imunodiagnóstico. Campilobacteriose venérea bovina.

Abstract

MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia. **Characterization of recombinant proteins and monoclonal antibodies for the development of vaccines and diagnostic tests.** 2013. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The first project addressed the development of a vaccine against gas gangrene caused by *Clostridium septicum*. This bacterium is a major cause of the disease in Brazilian livestock. Among the toxins produced by this pathogen, the alpha-toxin of *C. septicum* (ATCS) is essential for virulence. As with other clostridial diseases, the most effective and viable conduct for the control of this disease is vaccination. However, the vaccines available on the market involve a high risk production with an unpredictable yield. Furthermore, there is no control of these vaccines, which may explain the low levels of protection in vaccinated animals. In the present work, ATCS was produced in *Escherichia coli*. The protein was obtained in the form of inclusion bodies (IB), which were purified, resulting in a yield of approximately 30mg/L of culture. Moreover, suspensions of IB and bacterins expressing rATCS were prepared. These three vaccine components will be tested in animal models to evaluate the effectiveness of protection. The second project involved the development of diagnostic tests for *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* (Lm). Lm is a food-borne pathogenic bacterium, and is the main species causing listeriosis in humans and animals, especially in immunocompromised individuals. Due to the ubiquity and high resistance to adverse conditions, Lm is found in many foods, including in ready-to-eat ones. The traditional method of detection of this pathogen done by bacterial enrichment and culture, has a high cost and requires a long time until the final result is available. Thus, immunological methods serve as alternative to solve these problems. In this study, the monoclonal antibodies (MAbs) 3F8 (anti-*Listeria* spp.), 3B7 and 2D12 (both anti-Lm), previously produced by the Applied Immunology Laboratory (CDTec, UFPel) were evaluated in direct and sandwich ELISA. In the direct ELISA, the three MAbs peroxidase conjugates retained their ability to discriminate. In the sandwich ELISA, the optimal concentration for the capture steps was determined at 0,5µg per well for 3F8, and 1µg per well for 3B7 and 2D12. The protein fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) was determined as the target of 3F8. rFBA was produced in *E. coli* either as a soluble protein or solubilized with N-lauroylsarcosine, and used as an immunogen for producing hybridomas. The analysis of protein fractions of Lm - also used as immunogens - indicated that FBA was present in the cell wall, membrane and cytoplasm and was expressed at different levels during the bacterium growth. The final project was a partnership with the Bacteriology Laboratory (LABAC), from UFSM. In this, a new protein, named rSapAn78, was designed as a vaccine or diagnostic component for the pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Besides the expression of this protein, two other genes related to rSapAn78 individual subunits were subcloned into pAE vector for expression in *E. coli*. These three proteins will be further tested for their applicability, maintaining the cooperation between the laboratories involved in the research.

Keywords: *Clostridium septicum*. Recombinant vaccine. Listeriosis. Immunodiagnostic. Bovine venereal campylobacteriosis.

Lista de Figuras

Figura 1	Imagem do plasmídeo e gel de agarose 0,8% das extrações de pBSK- <i>tacs</i>	29
Figura 2	Gel de agarose 0,8% para quantificação do vetor pAE e do gene <i>tacs</i> com λ DNA/ <i>Hind</i> III (Invitrogen).....	30
Figura 3	Gel de agarose 0,8% para a triagem de clones recombinantes de pAE- <i>tacs</i>	31
Figura 4	SDS-PAGE 12% das expressões de rTACS em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star e pLysS.....	32
Figura 5	Análise da solubilidade de rTACS em diferentes tampões.....	33
Figura 6	SDS-PAGE 12% da purificação e diálise de rTACS.....	34
Figura 7	Verificação da expressão de rTACS para a preparação das bacterinas recombinantes e CI em SDS-PAGE 12%.....	35
Figura 8	SDS-PAGE 12% e <i>Western blot</i> dos dois possíveis alvos de 3F8.....	53
Figura 9	Análise da solubilidade e purificação de rFBA por SDS-PAGE 12%..	54
Figura 10	<i>Western blot</i> com 3F8 das frações celulares de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117 (Lm19117).....	55
Figura 11	ELISA para avaliação da resposta humoral de três camundongos (C1, C2 e C3) contra rFBA para a produção de MAbs.....	57
Figura 12	Purificação dos MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 por cromatografia em coluna de proteína A (GE Healthcare).....	58
Figura 13	Avaliação dos MAbs purificados por ELISA indireto.....	59
Figura 14	ELISA para titulação dos MAbs conjugados com peroxidase.....	60
Figura 15	Desenvolvimento de ELISA direto utilizando os MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 conjugados com peroxidase.....	62
Figura 16	Testes da quantidade dos anticorpos 3F8, 3B7 e 2D12 para realizar a captura do ELISA sanduíche.....	64
Figura 17	Representação dos genes que codificam as 9 variantes da proteína SapA (adaptado de TU et al., 2003).....	67

Figura 18	Representação do gene desenhado e de seus possíveis produtos proteicos.....	69
Figura 19	Gel de agarose 0,8% das extrações de pUC18- <i>sapAn78</i> e das digestões para a subclonagem.....	71
Figura 20	Gel de agarose 0,8% para quantificação do vetor pAE e do gene <i>sapAn78</i> com λ DNA/HindIII (Invitrogen) e triagem de clones recombinantes.....	72
Figura 21	Verificação da extração e digestão para a confirmação da presença de inserto em pAE- <i>sapAn78</i>	73
Figura 22	SDS-PAGE 12% do teste de expressão de rSapAn78 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	73
Figura 23	Géis de agarose 0,8% das etapas de obtenção dos plasmídeos pAE- <i>sapAn</i> e pAE- <i>sapA78</i>	74
Figura 24	Gel de agarose 0,8% da purificação e digestão dos plasmídeos pAE- <i>sapAn</i> e pAE- <i>sapA78</i> para a confirmação de inserto.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resumo das formulações de rFBA inoculadas nos camundongos para a produção de MAbs.....	45
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA – albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CI – corpos de inclusão

CVB – campilobacteriose venérea bovina

DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

EBI – Instituto Europeu de Bioinformática (*European Bioinformatics Institute*)

ELISA – ensaio imunoenzimático

FBA – frutose 1,6-bisfosfato aldolase

GPI – glicosil-fosfatidil-inositol

h – hora

HAT-20 – meio Hipoxantina-Aminopterina-Tiamina contendo 20% de soro fetal bovino

HIV – vírus da imunodeficiência adquirida

InIA – internalina A

IPTG – isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – kilodaltons

L – litro

LABAC – Laboratório de Bacteriologia

LB – Luria-Bertani

Linn – *Listeria innocua*

Lm – *Listeria monocytogenes*

Lseel – *Listeria seeligeri*

M – molar

MAb – anticorpo monoclonal

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min – minuto

mL – mililitro

mM - milimolar

ng – nanogramas

NLS – N-lauroilsarcosine

p/v – peso por volume

pb – pares de bases

PBS – solução salina tamponada com fosfato

rpm – rotações por minuto

SAG – antígenos de superfície de *Toxoplasma gondii*

Salmo – *Salmonella* Enteritidis

SAP – proteínas de superfície de *Campylobacter* spp.

SP₂ – células de mieloma de camundongo

TA – toxina alfa

TACS – toxina alfa de *Clostridium septicum*

TSB-YE – caldo de soja tripsinizada acrescido de extrato de levedura

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

v/v – volume por volume

µg – microgramas

µL – microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	18
2. Projeto 1 – Clonagem e expressão da toxina alfa recombinante de <i>Clostridium septicum</i> (rTACS) em <i>Escherichia coli</i>	20
2.1. Revisão Bibliográfica.....	20
2.2. Objetivos.....	24
2.2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2.2. Objetivos Específicos.....	24
2.3. Materiais e Métodos.....	25
2.3.1. Desenho e clonagem de <i>tacs</i>	25
2.3.2. Expressão, caracterização e purificação da proteína rTACS.....	26
2.3.3. Preparo de bacterinas recombinantes e corpos de inclusão (CI) de rTACS.....	28
2.4. Resultados.....	29
2.4.1. Subclonagem do gene <i>tacs</i> no vetor de expressão pAE.....	29
2.4.2. Expressão, purificação e renaturação de rTACS.....	31
2.4.3. Caracterização das bacterinas recombinantes e CI de rTACS.....	34
2.5. Conclusões e perspectivas.....	35
3. Projeto 2 – Aplicação e desenvolvimento de anticorpos monoclonais para testes diagnósticos de <i>Listeria spp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.1. Revisão Bibliográfica.....	37
3.2. Objetivos.....	41
3.2.1. Objetivo Geral.....	41
3.2.2. Objetivos Específicos.....	41
3.3. Materiais e Métodos.....	42
3.3.1. Definição do alvo do MAb 3F8.....	42
3.3.2. Expressão e purificação da proteína rFBA.....	43
3.3.3. Fracionamento de proteínas de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117.....	43
3.3.4. Produção de anticorpos monoclonais.....	44

3.3.5. Purificação dos anticorpos monoclonais 3F8, 3B7 e 2D12.....	48
3.3.6. Cultivo das bactérias.....	48
3.3.7. ELISA indireto.....	49
3.3.8. Marcação e titulação dos anticorpos monoclonais com peroxidase.....	50
3.3.9. ELISA direto.....	51
3.3.10. ELISA sanduíche.....	52
3.4. Resultados.....	52
3.4.1. Determinação do alvo do MAb 3F8.....	52
3.4.2. Avaliação da solubilidade da proteína rFBA.....	54
3.4.3. Análise das frações proteicas de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117 quanto à presença de FBA.....	54
3.4.4. Monitoramento da resposta imune de camundongos imunizados com rFBA.....	56
3.4.5. Purificação dos MAbs 3F8, 3B7 e 2D12.....	58
3.4.6. ELISA indireto.....	58
3.4.7. Titulação dos MAbs marcados e desenvolvimento de ELISA direto.....	59
3.4.8. ELISA sanduíche.....	63
3.5. Conclusões e perspectivas.....	64
4. Atividades Extras.....	66
4.1. Construção e expressão de uma nova proteína para o desenvolvimento de vacina e/ou teste diagnóstico para <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	66
4.1.1. Introdução.....	66
4.1.2. Objetivos.....	68
4.1.2.1. Objetivo Geral.....	68
4.1.2.2. Objetivos Específicos.....	68
4.1.3. Materiais e Métodos.....	68
4.1.3.1. Desenho do gene sintético <i>sapAn78</i>	68
4.1.3.2. Clonagem e expressão dos genes <i>sapAn78</i> , <i>sapAn</i> e <i>sapA78</i>	70
4.1.4. Resultados.....	70
4.1.4.1. Clonagem e expressão do gene <i>sapAn78</i>	70

4.1.4.2. Clonagem dos genes <i>sapAn</i> e <i>sapA78</i>	74
4.1.5. Conclusões e perspectivas.....	75
5. Referências.....	75

1. Introdução Geral

No segundo semestre de 2009, iniciei como estagiário do Laboratório de Imunologia Aplicada, situado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Núcleo de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas. Desde então, acompanhei diversos projetos de grande relevância no meu aprendizado como aluno de Iniciação Científica. O laboratório, coordenado pelo Professor Doutor Fabricio Rochedo Conceição, tem suas principais linhas de pesquisa voltadas para o desenvolvimento de proteínas recombinantes a serem aplicadas em vacinas e diagnósticos. Recentemente, seu grupo desenvolveu vacinas contra diversos micro-organismos patogênicos de importância veterinária (CONCEIÇÃO et al., 2006; MICHELON et al., 2006; FISCHER et al., 2007; SEIXAS et al., 2007; ROCHA et al., 2008). Devido aos animadores resultados obtidos no teste de uma vacina contra o patógeno *Clostridium perfringens* (MILACH et al., 2012), o interesse no desenvolvimento de outras vacinas contra clostridioses aumentou. Assim, unindo minha experiência prévia sobre biologia molecular e expressão de proteínas, parte de meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi voltado para o desenvolvimento de uma vacina contra o patógeno *C. septicum*. Ainda, considerando que o laboratório também possui trabalhos no desenvolvimento e aplicação de anticorpos monoclonais (MAbs) (MENDONÇA et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2012), outra parte de meu TCC foi voltada para a aplicação e desenvolvimento dessas moléculas para detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. Para isso, as atividades foram desenvolvidas sob supervisão e acompanhamento do Dr. Marcelo Mendonça, do Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTEC, UFPel. Além desses dois projetos principais, outro trabalho é apresentado como atividade adicional: a produção de uma nova proteína para aplicação em testes diagnóstico ou vacina contra o patógeno bovino *Campylobacter fetus*, causador da campilobacteriose

venérea bovina (CVB). Devido à diversidade dos projetos acompanhados, os resultados serão devidamente divididos e formatados em uma mescla de relatório e artigo científico de modo que sejam facilmente modificados para posterior publicação em periódicos da área. Além de terem sido imprescindíveis para meu aprendizado e minha formação em pesquisa, os trabalhos desenvolvidos nesse TCC permitirão o posterior seguimento dessas linhas, uma vez que pretendo prosseguir na área acadêmica.

2. Projeto 1 – Clonagem e expressão da toxina alfa recombinante de *Clostridium septicum* (rTACS) em *Escherichia coli*

2.1. Revisão Bibliográfica

O micro-organismo *C. septicum* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito e com capacidade de formar esporos. Essa bactéria é encontrada nos mais diversos locais da natureza, desde o ambiente até o trato gastrointestinal de mamíferos (HATHEWAY, 1990). Ela é definida como um patógeno oportunista, podendo causar infecções em imunodeprimidos. Em humanos, esta doença é relacionada com problemas no intestino, principalmente, com o câncer colorretal e doenças hematológicas (CHEW; LUBOWSKI, 2001). Já em animais, a infecção é decorrente de feridas ou de práticas que envolvam a manipulação do animal, como a castração, vacinação inadequada, parto, entre outras (MORRIS et al., 2002).

A gangrena gasosa, ou mionecrose, ou edema maligno é a doença desenvolvida após a infecção por *C. septicum*. Esse patógeno é o segundo que mais causa essa enfermidade em bovinos, ficando atrás apenas de *C. chauvoei* (ASSIS et al., 2010). Outras bactérias do gênero, como *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordellii*, entre outras (SASAKI et al., 2002), também podem causar a doença tanto sozinhas quanto em associação, inclusive com *C. septicum*, causando morte tecidual por necrose (STEVENS et al., 1997). Por infectar, principalmente, regiões profundas do tecido muscular, essa doença é de difícil tratamento e diagnóstico quando comparada com infecções superficiais. Na saúde humana, uma das alternativas para salvar a vida de pessoas infectadas é através da amputação de membros ou remoção do local infectado (GNERLICH et al., 2011). Além da cirurgia, o tratamento é feito através da administração de antibióticos e de sessões de terapia com oxigênio hiperbárico, as quais não são efetivas quando utilizadas sozinhas

(ECONOMEDES et al., 2012; GNERLICH et al., 2011; LARSON et al., 1995). Para animais, não é descrito tratamento efetivo, uma vez que a maioria dos animais infectados é diagnosticada após a morte ou em estágio terminal. Além disso, o alto custo de antibióticos ou da terapia de oxigênio, por exemplo, inviabiliza a remediação desses animais. Assim, do mesmo modo como ocorre para outras clostridioses, a melhor alternativa para o controle dessa doença é através da vacinação, principalmente com a produção de anticorpos neutralizantes (JOHNSON, 1997; SMITH, 2009).

Devido à falta de estudos epidemiológicos no Brasil, é difícil estabelecer os prejuízos financeiros decorrentes da morte de animais por infecções de *C. septicum* (SALVARANI et al., 2010). Entretanto, alguns surtos são descritos envolvendo diversas espécies de animais de produção. Em 2006, foi descrito a morte de 30 caprinos e 40 ovinos infectados com *C. septicum* e *C. novyi* associados (LIMA et al., 2006). Em outro surto, 58 bovinos morreram pela infecção de apenas *C. septicum* (ASSIS et al., 2002). Em ambos os estudos a infecção ocorreu após vacinação contra clostridioses, sugerindo falha na preparação ou formulação das vacinas. De fato, as vacinas comerciais brasileiras não atingem os pré-requisitos determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza que as vacinas gerem 2,5UI/mL de anticorpos neutralizantes em soros de coelhos imunizados após o ensaio de soroneutralização de camundongos. Isso indica possíveis problemas quanto sua vigilância (LOBATO et al., 2008).

Ao infectar o hospedeiro, essa bactéria produz 4 toxinas principais: alfa (letal ou necrótica), beta (DNAse), gama (hialuronidase) e delta (septicolisina ou hemolisina) (HATHEWAY, 1990). Dessas, a toxina alfa é a mais estudada, uma vez que ela sozinha possui atividades biológicas relacionadas com o desenvolvimento

da doença. Além disso, a mutação deletéria do gene *csa* que a codifica é capaz de eliminar a toxicidade de cepas de *C. septicum* (KENNEDY et al., 2005). Ela é uma proteína de caráter básico, com massa aparente inicial de 48kDa (BALLARD et al., 1992). Assim como outras toxinas do gênero *Clostridium*, a toxina alpha de *C. septicum* (TACS) é inicialmente produzida como uma pré-pró-toxina de 443 aminoácidos, a qual possui um peptídeo sinal em sua região N-terminal e outro na C-terminal. Quando a toxina é secretada, seu peptídeo N-terminal de 31 aminoácidos é clivado por enzimas do sistema de secreção tipo II, dando origem à pró-toxina. Finalmente, outro peptídeo sinal, de 45 aminoácidos, é removido de sua região C-terminal pela ação de proteases do hospedeiro, como a tripsina e furina, de modo a originar a toxina ativa, que possui 367 aminoácidos (41kDa) (BALLARD et al., 1995; GORDON et al., 1997).

A TACS possui atividade hemolítica, sendo considerada a mais importante para o desenvolvimento da doença (BALLARD et al., 1992, 1993). Sua atividade depende da ligação em proteínas associadas ao glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), como a Contactina (GORDON et al., 1999) e os antígenos de superfície de *Toxoplasma gondii* SAG1 e SAG3 (WICHROSKI et al., 2002). As proteínas associadas ao GPI correspondem a um grupo presente na maioria dos mamíferos, explicando a ampla variedade de hospedeiros susceptíveis à intoxicação por TACS (HANG'OMBE et al., 2005). A ligação de monômeros ativos da TACS nesses componentes da superfície celular aumenta a taxa de oligomerização da toxina. Desse modo, ela é capaz de formar heptâmeros em forma de poros, com aproximadamente 1,6 nm de diâmetro, na membrana das células do hospedeiro (SELLMAN et al., 1997). Sendo assim, o peptídeo C-terminal de TACS atua como

um inibidor de agregação, impedindo que a toxina inativa se agregue antes da interação com suas células-alvo (SELLMAN; TWETEN, 1997).

Embora apresente mecanismos de ação parecidos, as toxinas alfa de *C. histolyticum*, *C. chauvoei* e *C. difficile* são pouco similares com a TACS. Além disso, anticorpos produzidos contra uma não resultam em reações cruzadas com outras (BALLARD et al., 1992). Isso sugere que a preparação de vacinas contra essa toxina deve contar com anticorpos específicos, induzidos exclusivamente por sua molécula. Estudos mostram que a administração apenas da TACS nativa, inativada com formaldeído, foi capaz de proteger cobaios desafiados com esporos da bactéria (AMIMOTO et al., 2002) e que a toxina recombinante produzida em *E. coli* é capaz de proteger camundongos do desafio com a toxina nativa (ZHANG et al., 2007). A toxina beta possui 45kDa e nunca foi relatada como antígeno vacinal. As toxinas gama e delta também não são relatadas como antígenos vacinais.

As vacinas atuais comercialmente disponíveis contra *C. septicum* consistem em toxoides ou bacterinas, podendo, inclusive, conter a mistura desses componentes. Ainda, a maioria se trata de vacinas polivalentes que não são efetivas na proteção contra esse patógeno, uma vez que apenas 5/12 funcionaram em um teste feito em coelhos e bovinos (LOBATO et al., 2008). Isso explica os diversos relatos da literatura quanto à ineficiência desse tipo de vacinas na proteção contra intoxicações por *C. septicum* ou, inclusive, sua falta de segurança (ASSIS et al., 2002; LIMA et al., 2006). Além desses problemas, o processo para a produção de vacinas contra o gênero *Clostridium* se mostra complicado. Isso porque as bactérias devem ser cultivadas em condições anaeróbias com diversos suplementos no meio de cultura, além de render baixas quantidades de toxina quando passadas à escala industrial. Outro fator negativo é que grande parte desses patógenos e toxinas

podem promover o desenvolvimento de doenças em humanos, representando grande risco para os operadores e para a população, caso não haja manipulação ou descarte adequado de material biológico (LEE et al., 2007; MANSOUR et al., 2010).

Levando em consideração o panorama atual sobre vacinas contra *C. septicum*, o presente trabalho demonstra o desenvolvimento de uma vacina composta pela TACS recombinante (rTACS), produzida em *E. coli*. Assim, os problemas quanto aos processos atuais de produção poderiam ser resolvidos, uma vez que haveria controle sobre a quantidade de vacina produzida bem como maior segurança por envolver uma expressão controlada de toxina em uma cepa de *E. coli* não patogênica. Ainda, a vacina seria formulada para superar os problemas de baixa eficiência e segurança das vacinas atuais.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma vacina recombinante para controle da gangrena gasosa causada por *Clostridium septicum* em animais de produção.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Clonar e expressar o gene da toxina alpha de *Clostridium septicum* (TACS) em vetor de expressão para *E. coli*;
- Avaliar a solubilidade da proteína rTACS em diferentes tampões;
- Caracterizar bacterinas recombinantes e corpos de inclusão de rTACS para uso vacinal.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Desenho e clonagem de *tacs*

A sequência de aminoácidos referente à TACS foi obtida no banco de dados GenBank (código 169639787). Essa sequência foi modificada para a retirada de seus peptídeos situados nas regiões N-terminal (31 aminoácidos) e C-terminal (45 aminoácidos), caracterizando a sequência da toxina ativa. A sequência codificadora foi encomendada da empresa Epoch Life Science (Missouri City, Texas, EUA) contendo códons preferenciais para expressão em *E. coli*, bem como os sítios de restrição *XhoI* e *NcoI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O gene encomendado vem clonado no plasmídeo pBSK, sendo chamado de pBSK-*tacs*. Esse plasmídeo foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 por choque térmico, assim como o vetor pAE de expressão em *E. coli*, seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). As transformações foram cultivadas em caldo LB contendo 100µg/mL de ampicilina por 16h em agitador 150rpm a 37°C e, em seguida, foi procedida a extração de plasmídeos com o kit *Illustra plasmidPrep mini spin* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Esse plasmídeos foram digeridos com as enzimas *XhoI* (New England Biolabs) e *NcoI* (Thermo Scientific) simultaneamente utilizando o tampão Tango (Thermo Scientific) concentrado duas vezes. As digestões foram incubadas por 2h a 37°C e, em seguida, ambos pBSK-*tacs* e pAE foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Após a confirmação da digestão, o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) foi utilizado para purificar o fragmento correspondente ao gene do gel e o pAE digerido diretamente da reação. Após a purificação, tanto o inserto quanto o pAE, ambos digeridos, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação com λ DNA/*HindIII* (Invitrogen). Em seguida, o gene *tacs* e o vetor

foram submetidos à reação de ligação com T4 DNA ligase (Thermo Scientific) utilizando proporção molar de vetor-inserto 1:3, conforme instruções do fabricante. A reação foi incubada por 1h a 37°C e, após, 5µL de seu produto foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 por choque térmico conforme já descrito. Após a transformação, as células foram espalhadas em meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas por 16h em estufa a 37°C. As colônias transformantes tiveram seu DNA extraído com fenol-clorofórmio e aplicado em gel de agarose 0,8%, o qual foi analisado quanto à presença de colônias recombinantes. Cinco clones recombinantes foram escolhidos, cultivados em 10mL de caldo LB com 100µg/mL de ampicilina a 37°C em agitador 150rpm e submetidos à extração plasmideal por lise alcalina. Em seguida, a confirmação da extração foi feita por gel de agarose 0,8%. Ainda, a presença do inserto correspondente ao plasmídeo pAE-*tacs* foi confirmada em três dos cinco clones através da digestão de três dos cinco clones com as enzimas *Xho*I e *Nco*I do mesmo modo como descrito anteriormente.

2.3.2. Expressão, caracterização e purificação da proteína rTACS

Um dos três plasmídeos pAE-*tacs* caracterizados por digestão foi utilizado para transformar as cepas de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star e pLysS por choque-térmico. O produto da transformação foi cultivado em 10 mL de caldo LB contendo 100µg/mL de ampicilina em agitador 150rpm a 37°C por 16h. Para a cepa pLysS, todos os cultivos receberam, também, 25µg/mL de cloranfenicol. Em seguida, 1mL de ambos cultivos foi passado para mais 10mL de caldo LB contendo a mesma quantidade de antibióticos e cultivado nas mesmas condições. Quando atingiu densidade óptica relativa à metade da fase *log* ($DO_{600}=0,5-0,8$), a expressão foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração

final de 0,5mM. Esse cultivo foi deixado mais 4h em agitador 150rpm a 37°C e, em seguida, tiveram 1mL recolhido, centrifugado 16.000g por 30s, suspenso em H₂O Milli-Q com tampão de corrida para avaliação por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

Após a confirmação da expressão, a cepa pLysS foi escolhida para realizar a expressão em maior escala. Dessa vez, um clone de pAE-*tacs* foi utilizado para transformar a cepa pLysS por coque-térmico, sendo o produto utilizado para inocular 30mL de caldo LB contendo 100µg/mL de ampicilina e 25µg/mL de cloranfenicol, o qual foi cultivado em agitador 150rpm a 37°C por 16h. Logo, esse volume foi transferido para um erlenmeyer contendo 470mL de caldo LB com a mesma concentração de antibióticos. Ao atingir a DO₆₀₀=0,5-0,8, a expressão foi induzida com IPTG por 4h, da mesma forma como já descrito. Em seguida, o cultivo foi centrifugado (16.000g; 4°C; 10min), o *pellet* foi suspenso em 20mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 0,2M; NaCl 0,5M; Imidazole 10mM) com 100µg/mL de lisozima e incubado por 2h a 4°C. As células foram rompidas por sonicação em três ciclos de 20s e centrifugadas do mesmo modo. O sobrenadante foi recuperado, o *pellet* foi suspenso em tampão de solubilização I (tampão de lise + N-lauroilsarcosine 0,2%) e deixado em agitação por 24h a 4°C. Essas etapas de agitação e posterior centrifugação com a recuperação do sobrenadante e suspensão do *pellet* foram repetidas com outros três tampões, o de solubilização II (tampão de lise + N-lauroilsarcosine 0,8%) e III (solubilização I + Ureia 8M). Todos os sobrenadantes obtidos foram avaliados em SDS-PAGE 12% e a confirmação da presença da proteína rTACS foi confirmada por *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His (Sigma Aldrich) e anticorpo anti-camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich).

As frações contendo a proteína rTACS foram purificadas por cromatografia de afinidade com Níquel (Ni^{+2}), em sistema manual, utilizando colunas *HisTrap FF crude* de 1mL (GE Healthcare) e tampão de eluição contendo Imidazole 0,5M. As frações purificadas foram verificadas por SDS-PAGE 12% quanto a presença de rTACS. Essas frações foram misturadas, dialisadas em PBS por 24h a 4°C e, posteriormente, em PBS + Triton X-100 0,05% (v/v) por mais 24h nas mesmas condições. O produto da diálise foi quantificado com o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e liofilizado para uso posterior.

2.3.3. Preparo de bacterinas recombinantes e corpos de inclusão (CI) de rTACS

As bacterinas recombinantes foram preparadas através do cultivo e expressão da proteína rTACS em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS conforme já descrito para o volume de 500mL. Após o período de expressão, o cultivo foi centrifugado (16.000g; 4°C; 15min) e suspenso em 25mL de PBS + formaldeído 0,3% (v/v). Essa suspensão ficou em agitador 150rpm por 24h a 37°C, sendo, em seguida, centrifugada (16.000g; 4°C; 15min) e lavada 3 vezes com PBS. O *pellet* final foi suspenso em 10 mL de PBS para a realização de contagem em câmara de Petroff-Hausser. A concentração de células foi ajustada para 10^9 células por mL utilizando PBS como diluente e logo congeladas para uso posterior. A confirmação da inativação das bactérias foi feita através do espalhamento de 100 μ L dessa suspensão, antes do congelamento, em LB-ágar por 24h a 37°C.

Para a preparação dos CI, as mesmas etapas para a expressão de rTACS em 500mL foram seguidas até a utilização do tampão de solubilização II. Após o tratamento com esse tampão, o *pellet*, correspondente aos CI foi lavado com 35mL

de PBS e centrifugado novamente. O *pellet* resultante foi suspenso em 20mL de PBS e sonificado em três ciclos de 20s para fragmentação dos CI. Feito isso, a suspensão foi avaliada por SDS-PAGE 12%, quantificada com o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e congelada a -20°C para uso posterior.

2.4. Resultados

2.4.1. Subclonagem do gene *tacs* no vetor de expressão pAE

O plasmídeo pBSK-*tacs* encomendado foi extraído (Fig. 1A e 1B) e, em seguida, digerido com as enzimas *XhoI* e *NcoI*, apresentando uma banda correspondente ao do gene desenhado (1.100 pb) (Fig. 1C).

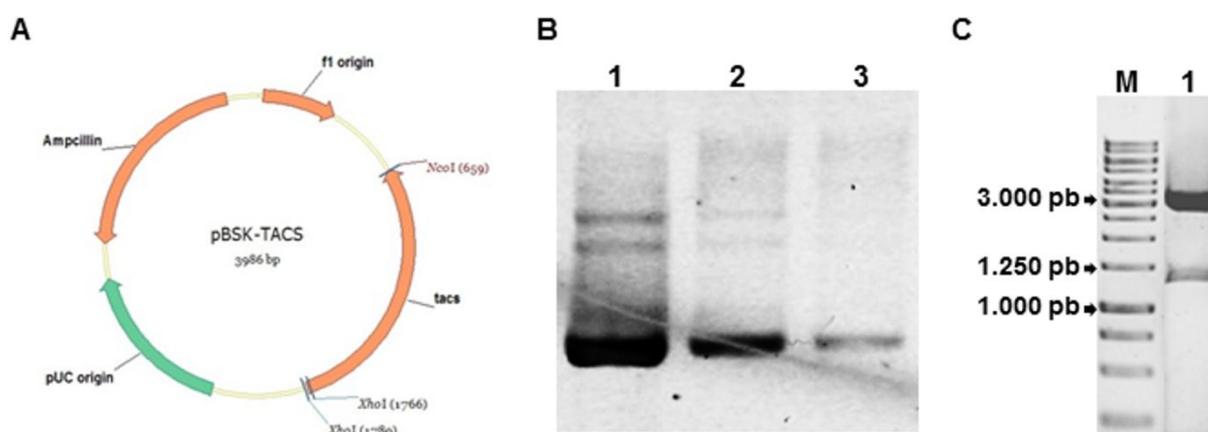


Figura 1 – Imagem do plasmídeo e gel de agarose 0,8% das extrações de pBSK-*tacs*. **(A)** Imagem do plasmídeo pBSK-*tacs* encomendado da Epoch Life Science, mostrando sua orientação e sítios de restrição para *XhoI* e *NcoI*. **(B)** Gel de agarose 0,8% com 3 eluições de pBSK-*tacs* purificado. 1- eluição 1; 2- eluição 2; 3- eluição 3. **(C)** Plasmídeo pBSK-*tacs* digerido com *XhoI* e *NcoI*. **M**- marcador 1Kb (Thermo Scientific) 1- pBSK-*tacs*.

Após purificar o gene *tacs* do gel e o vetor pAE da reação, ambos foram quantificados antes da ligação por T4 DNA ligase para a formação do vetor pAE-*tacs* (Fig. 2).

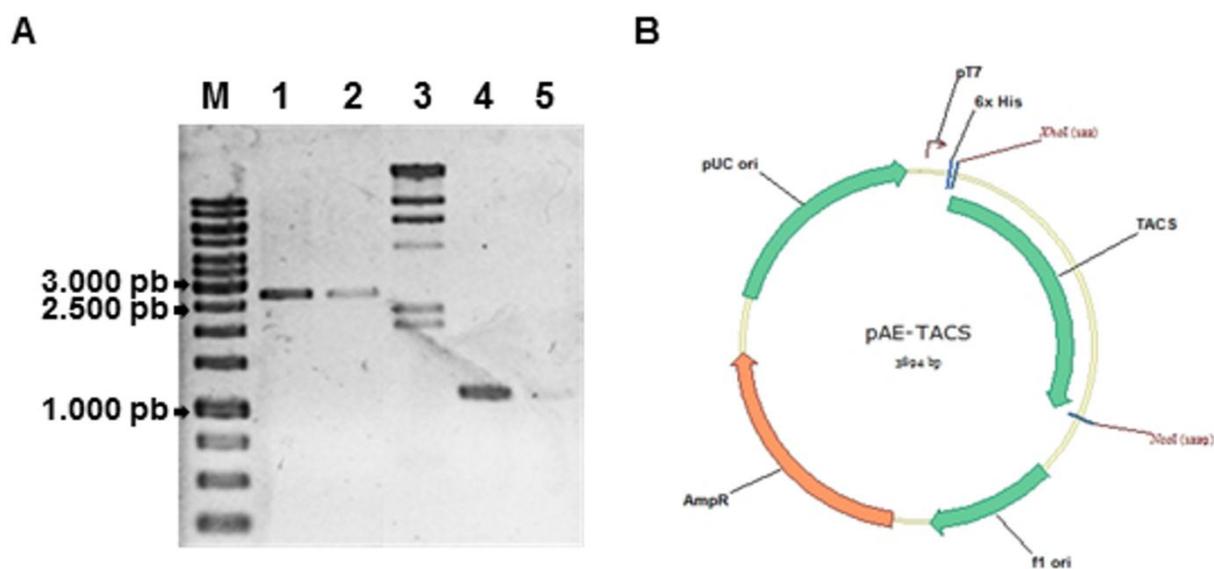


Figura 2 – Gel de agarose 0,8% para quantificação do vetor pAE e do gene *tacs* com λ DNA/*Hind*III (Invitrogen). **(A)** Gel de agarose 0,8% da purificação de pAE e *tacs* digeridos. **M**- marcador 1kb (Thermo Scientific); **1**- pAE/*Xho*I e *Nco*I eluição 1; **2**- pAE/*Xho*I e *Nco*I eluição 2; **3**- λ DNA/*Hind*III 250 ng; **4**- *tacs*/*Xho*I e *Nco*I eluição 1; **5**- *tacs*/*Xho*I e *Nco*I eluição 2. **(B)** Imagem do plasmídeo pAE-*tacs* construído após a ligação com T4 DNA ligase.

Após transformar *E. coli* TOP10 com o produto da ligação e cultivar essas células em LB-ágar, 6 colônias passaram por triagem (Fig. 3A). Três delas, das 4 identificadas como recombinantes, foram cultivadas para extração plasmideal e analisadas novamente quanto ao seu padrão de eletroforese (Fig. 3B). Todos os clones avaliados possuíam altura coerente ao plasmídeo pAE-*tacs* (3.894 pb), uma vez que se apresentaram maiores que o pAE (2.822 pb). Esses plasmídeos foram digeridos com *Xho*I e *Nco*I para a confirmação da presença do inserto no vetor de expressão. Assim, a banda correspondente à do gene *tacs* (1.100 pb) foi novamente identificada (Fig. 3C).

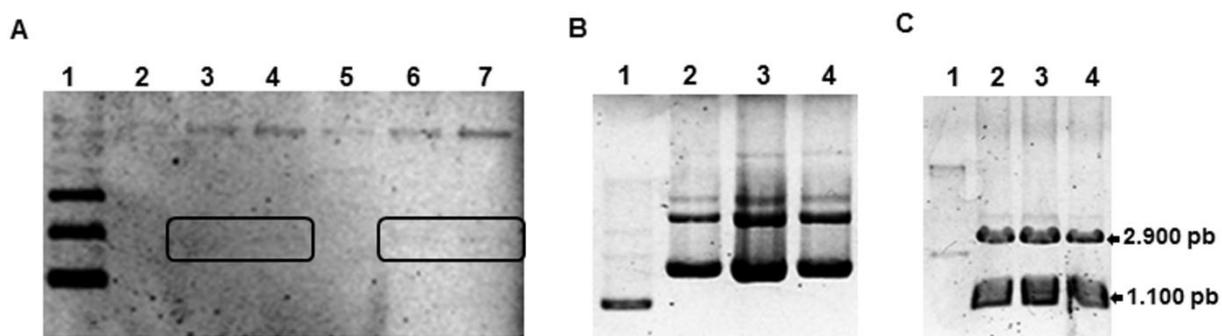


Figura 3 – Gel de agarose 0,8% para a triagem de clones recombinantes de pAE-*tacs*. **(A)** Extração plasmideal por lise alcalina de 6 colônias (col.) transformantes. 1- pAE circular; 2- col. 1; 3- col. 2; 4- col. 3; 5- col. 4; 6- col. 5; 7- col. 6. **(B)** Extração plasmideal por lise alcalina de 3 clones transformantes, possivelmente, de pAE-*tacs*. 1- pAE circular; 2- clone 1; 3- clone 2; 4- clone 3. **(C)** Digestão dos 3 clones com *Xho*I e *Nco*I. 1- pAE circular; 2- clone 1; 3- clone 2; 4- clone 3.

2.4.2. Expressão, purificação e renaturação de rTACS

Os três clones avaliados foram utilizados para transformar as cepas de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star e pLysS. Após o período de indução, a expressão nas duas cepas foi avaliada por SDS-PAGE 12% (Fig. 4). Uma vez que os 3 clones apresentaram padrões de eletroforese semelhantes na cepa pLysS, ela foi escolhida para expressão em maior escala.

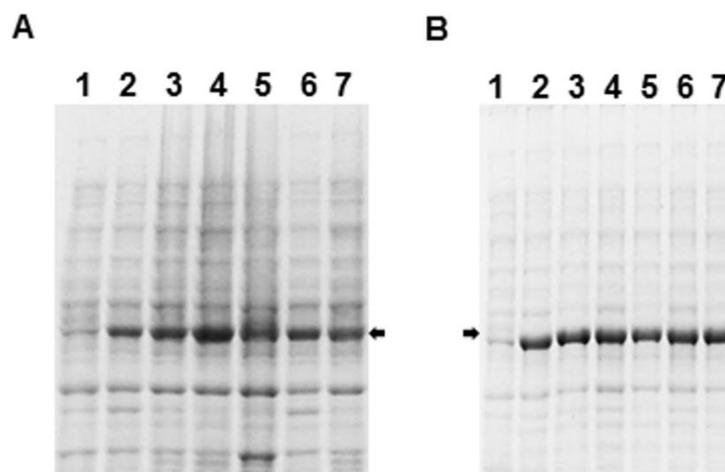


Figura 4 – SDS-PAGE 12% das expressões de rTACS em *E. coli* BL21 (DE3) Star e pLysS. **(A)** Eletroforese da expressão de 3 clones de pAE-*tacs* em *E. coli* Star. 1- extrato de *E. coli* Star (C-); 2- clone 1 não induzido; 3- clone 1 induzido; 4- Clone 2 não induzido; 5- clone 2 induzido; 6- clone 3 não induzido; 7- clone 3 induzido. **(B)** Eletroforese da expressão de 3 clones de pAE-*tacs* em *E. coli* pLysS. 1- Extrato de *E. coli* pLysS (C-); 2- clone 1 não induzido; 3- clone 1 induzido; 4- clone 2 não induzido; 5- clone 2 induzido; 6- clone 3 não induzido; 7- clone 3 induzido.

A proteína rTACS obtida após a expressão em 500mL de LB foi avaliada quanto sua solubilidade em diferentes tampões (Fig. 5A). Foi constatado que a maior parte da proteína era expressa na forma de CI, sendo presente na fração insolúvel obtida utilizando tampão de solubilização III, que contém ureia 8M. A confirmação de que a banda insolúvel se tratava da proteína rTACS foi confirmada por *Western blot*, onde apresentou massa aparente de 42kDa (Fig. 5B).

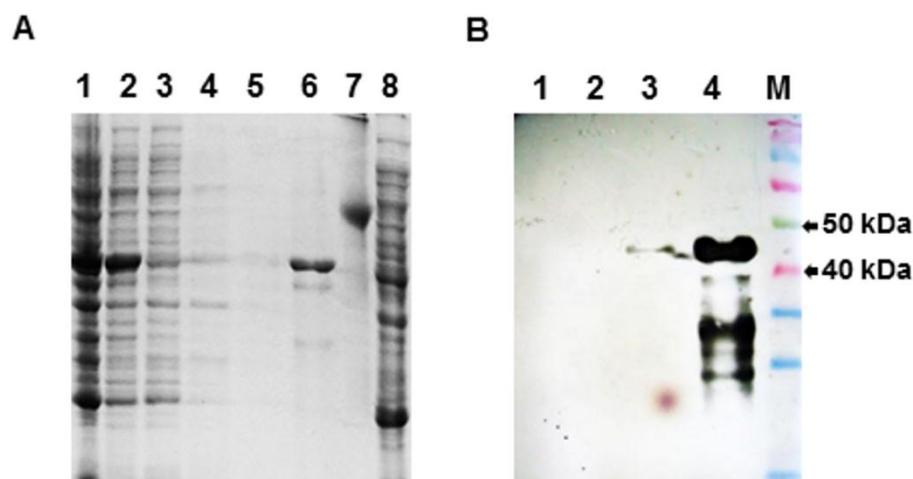


Figura 5 – Análise da solubilidade de rTACS em diferentes tampões. **(A)** SDS-PAGE 12% das suspensões resultantes da solubilização. 1- *E. coli* pLysS/pAE-*tacs* não induzida; 2- *E. coli* pLysS/pAE-*tacs* induzida; 3- sobrenadante tampão de lise; 4- sobrenadante tampão de solubilização I; 5- sobrenadante tampão de solubilização II; 6- sobrenadante tampão de solubilização III; 7- BSA 1,5 μ g (67kDa); 8- Extrato *E. coli* pLysS (C-). **(B)** *Western blotting* das frações contendo rTACS. 1- Extrato *E. coli* pLysS (C-); 2- sobrenadante tampão de lise; 3- sobrenadante tampão de solubilização I; 4- sobrenadante tampão de solubilização III; M- marcador pré-corado (Thermo Scientific).

A fração insolúvel foi purificada duas vezes por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺, sendo as frações coletadas avaliadas por SDS-PAGE 12% (Fig. 6A). As frações contendo a proteína foram misturadas, dialisadas e analisadas quanto sua integridade (Fig. 6B). As amostras dialisadas não apresentaram evidências de degradação durante o processo. Ainda, não mostraram níveis elevados de precipitação em tampão PBS + Triton X-100 em temperatura ambiente. A amostra dialisada foi quantificada, permitindo calcular o rendimento da expressão, que foi de aproximadamente 30 mg de proteína purificada por litro de cultivo.

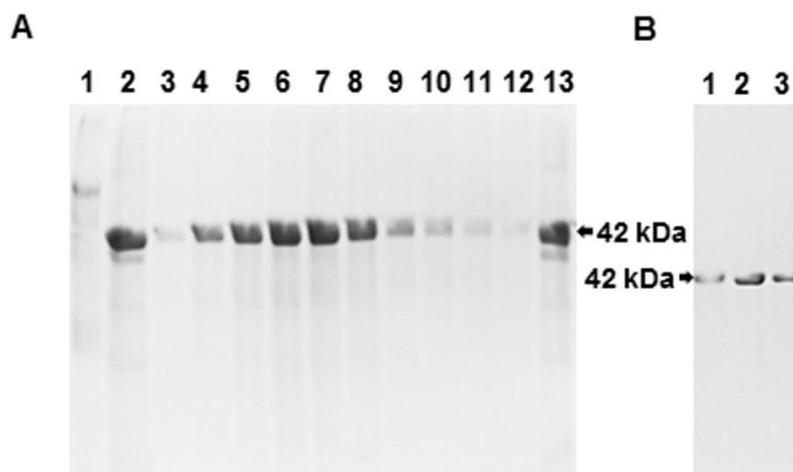


Figura 6 – SDS-PAGE 12% da purificação e diálise de rTACS. **(A)** Eletroforese da purificação de rTACS por afinidade ao Ni^{+2} . 1- BSA 1,5µg; 2- sobrenadante tampão de solubilização III; 3- lavagem purificação; 4-12- eluições de rTACS; 13- sobrenadante tampão de solubilização III após passagem na coluna. **(B)** Verificação da integridade de rTACS após as diálises. 1- rTACS antes das diálises; 2- rTACS após diálise em PBS; 3- rTACS após diálise em PBS + Triton X-100.

2.4.3. Caracterização das bacterinas recombinantes e CI de rTACS

A expressão de rTACS em 500 mL de LB foi efetuada novamente, sendo as amostras avaliadas quanto a expressão por SDS-PAGE 12% (Fig. 7A). Foi constatado que as células utilizadas para a elaboração das bacterinas possuía uma banda correspondente à altura de rTACS purificada. A contagem de células em câmara de Petroff-Hausser resultou em $\approx 8 \times 10^{10}$ células/mL. Desse modo as células foram diluídas 10 vezes com PBS, obtendo uma suspensão com aproximadamente $\approx 8 \times 10^9$ células/mL, a qual foi congelada para uso posterior. O cultivo dessa suspensão antes do congelamento não resultou em crescimento bacteriano, indicando que o procedimento de inativação foi efetivo.

Após a expressão de rTACS, as células foram processadas até a obtenção dos CI, antes da utilização do tampão de solubilização III. O *pellet* obtido foi

suspensão em PBS, sonificado e avaliado em SDS-PAGE 12% quanto sua integridade e homogeneidade (Fig. 7B). As amostras coletadas em diferentes momentos mostraram quantidades similares de proteína, indicando que a formulação a suspensão de CI em PBS é homogênea.

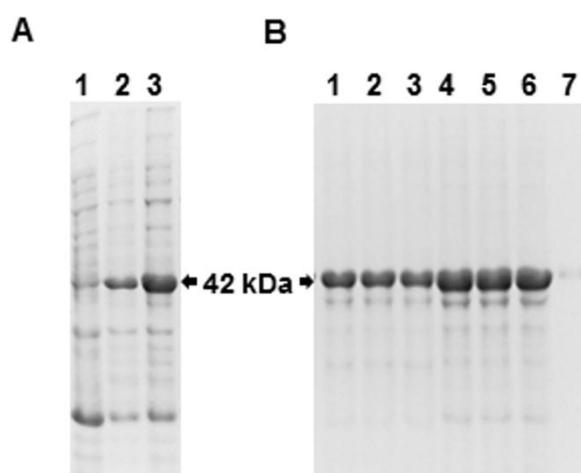


Figura 7 – Verificação da expressão de rTACS para a preparação das bacterinas recombinantes e CI em SDS-PAGE 12%. **(A)** 1- Extrato pLysS (C-); 2- *E. coli* pLysS/pAE-tacs não induzida; 3- *E. coli* pLysS/pAE-tacs induzida. **(B)** Avaliação da homogeneidade dos CI de rTACS. 1- CI amostra 1; 2- CI amostra 2; 3- CI amostra 3; 4- CI amostra 4; 5- CI amostra 5; 6- CI amostra 6; 7- rTACS purificada.

2.5. Conclusões e perspectivas

A expressão de rTACS utilizando um gene com códons preferenciais de *E. coli* se mostrou eficiente, uma vez que grandes quantidades de proteína puderam ser obtidas. Apesar de ser expressa na forma insolúvel, os CI de rTACS foram facilmente obtidos após o rompimento das células de *E. coli*, tornando-se uma ótima alternativa para a indústria, uma vez que rTACS poderia ser obtida com alto grau de pureza sem envolver processos complicados. Outra opção de produção industrial dessa vacina é o uso de bacterinas de *E. coli* recombinantes expressando rTACS. A obtenção de bacterinas já é um processo adaptado para a indústria, o que permitiria

a produção de vacinas em escala industrial sem a necessidade de mudança de maquinário. Desse modo, nosso grupo ainda testará essas 3 formas diferentes de vacina com esse antígeno recombinante: (1) rTACS purificada; (2) CI de rTACS; e (3) bacterinas recombinantes de rTACS. Inicialmente, essas 3 preparações serão testadas em camundongos quanto sua eficiência na produção de anticorpos neutralizantes. Posteriormente, as melhores formulações seriam submetidas a testes regulamentados em coelhos e, em seguida, nas espécies-alvo – principalmente bovinos. No caso de não ser efetiva nos testes em camundongos, essa proteína pode passar por melhoras em seu processo de produção, principalmente quanto sua solubilidade. Isso pode ser feito com o ajuste das condições de cultivo para que a proteína possa ser expressa de modo solúvel. Ainda, a utilização de outros vetores de expressão, que possuem caudas proteicas de solubilidade, é de interesse do grupo.

3. Projeto 2 – Aplicação e desenvolvimento de anticorpos monoclonais para testes diagnósticos de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*

3.1. Revisão Bibliográfica

O gênero *Listeria* compreende oito espécies diferentes: *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (ORSI et al., 2011). *Listeria* spp. são bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas, não possuem cápsula e não formam esporos (LECLERCQ et al., 2010). Dessas espécies, apenas as duas últimas são relatadas como patogênicas tanto para humanos quanto para animais (LECUIT, 2007; GUILLET et al., 2010). A infecção por *L. ivanovii* ocorre, principalmente, em animais, sendo pouco relatada em humanos. Já a infecção por *L. monocytogenes* é amplamente relatada tanto em humanos quanto em animais, causando infecções oportunistas relacionadas com a ingestão de alimentos contaminados (HAAS et al., 2007).

Por ser um micro-organismo ubíquo, a *L. monocytogenes* pode ser encontrada naturalmente na água, no solo, no trato gastrointestinal de mamíferos e, inclusive, em alimentos (NIGHTINGALE et al., 2005; LAER et al., 2009). Essa característica, associada à grande resistência da bactéria a variações de temperatura e pH, ao estresse osmótico e à falta de oxigênio, têm preocupado a indústria de alimentos embalados (SIMPSON et al., 2010). Por isso, inúmeros países, incluindo grande parte da Europa e os EUA, adotaram a política de “tolerância zero” para *L. monocytogenes* (CDC, 2011). Desse modo, todos os alimentos embalados devem passar por análises para presença ou ausência desse patógeno, sendo obrigatória a retirada de circulação em caso de presença (WHO/FAO, 2004). Apesar da adoção dessa medida, surtos de listeriose envolvendo alimentos contaminados continuaram a ser relatados, principalmente, nos EUA

(OLSEN et al., 2005; CDC, 2011). Apesar dessa repercussão internacional, ainda não houveram relatos de surtos no Brasil. No entanto, alguns estudos já comprovaram a presença de *L. monocytogenes* em diversos alimentos (BARROS et al., 2007; BUENO et al., 2010).

A listeriose é o termo utilizado para designar as doenças desenvolvidas a partir da infecção por, principalmente, *L. monocytogenes*. Basicamente, esse patógeno atua de duas formas, causando (1) listeriose não invasiva gastrointestinal e (2) listeriose invasiva. Em indivíduos saudáveis, é tipicamente desenvolvida a listeriose não invasiva, caracterizada por uma simples gastroenterite febril passageira (ALLERBERGER; WAGNER, 2010). Já em pacientes de risco, como crianças, idosos, imunossuprimidos, portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e grávidas, é comum o desenvolvimento de listeriose invasiva. Desse modo, o patógeno pode penetrar na corrente circulatória, o sistema nervoso central e, inclusive, o útero causando septicemia, meningite, meningoencefalite e aborto (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Apesar de possuir baixa incidência, em torno de 2-15 casos anuais a cada 1.000.000 de indivíduos, a listeriose possui fatalidade elevada, podendo chegar até 30% nos grupos suscetíveis (HAIN et al., 2007) e até 16% do total das pessoas infectadas. Assim, essa doença é a terceira causa de morte proveniente de infecções alimentares nos EUA (SCALLAN et al., 2011).

Essa abrangência de locais de infecção ocorre devido à capacidade da bactéria em infectar diferentes tipos de célula. Assim, *L. monocytogenes* é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e placentária e o epitélio intestinal, sendo este último considerado um pré-requisito para a ocorrência de infecções (WERBROUCK et al., 2006). Desse modo, a bactéria inicia seu processo de infecção colonizando o intestino e, posteriormente, invadindo seu epitélio para alcançar a via linfática ou

sistêmica, que levam à infecção de diversos locais e órgãos do corpo, como baço, fígado e linfonodos (PRON et al., 2001). Caso a infecção não seja controlada, o patógeno atinge, então, o encéfalo e a placenta (PLITAS et al., 2007).

Tal mecanismo de invasão é controlado por diversas proteínas secretadas ou de superfície do patógeno, produzidas quando ele atinge o ambiente intestinal (RAENGPRADUB et al., 2008; TROST et al., 2005). Dentre essas, as internalinas A e B (InIA e InIB) se destacam por promover a adesão e posterior invasão da bactéria nos enterócitos (WERBROUCK et al., 2006; PENTECOST et al., 2010). InIA apresenta características moleculares mais complexas quando comparada à InIB. No caso, além de regiões que interagem covalentemente com a parede celular bacteriana, InIA apresenta outras porções que permitem a interação com componentes celulares do hospedeiro (MENGAUD et al., 1996; PIZARRO-CERDÁ et al., 2007). Por sua vez, InIB não é covalentemente associada à parede celular e, ainda, não se trata de uma adesina, como a InIA, sendo caracterizada como a segunda mais importante invasina de *L. monocytogenes* (PENTECOST et al., 2010).

Atualmente, o método padrão para a detecção de *L. monocytogenes* é baseado no enriquecimento, cultivo, isolamento e testes bioquímicos. No entanto, esse protocolo é considerado laborioso, possuindo custo elevado e, principalmente, demora até o resultado (JANZTEN et al., 2006). O fato de o resultado demorar até 7 dias para determinar a presença desse patógeno é um problema para a indústria alimentícia, uma vez que não é viável estocar o produto durante esse período antes de sua venda. Desse modo, testes mais rápidos são de interesse. Alguns deles, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização de DNA e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), mostram valores de especificidade e sensibilidade semelhantes aos do método tradicional (GASANOV et al., 2005). No

entanto, o método tradicional ainda é considerado o “padrão ouro” devido sua alta especificidade e aos resultados abaixo do esperado das tecnologias rápidas (JANZTEN et al., 2006). Portanto, ainda é de interesse o desenvolvimento de novos métodos de detecção para *L. monocytogenes*.

Em um alimento contaminado são encontradas tanto espécies patogênicas quanto não patogênicas do gênero *Listeria* (O’CONNOR et al., 2010). Utilizando a metodologia tradicional de detecção, que emprega meios de enriquecimento, normalmente essas últimas se sobressaem, podendo gerar resultados falso-negativos (ORAVCOVÁ et al., 2008; BESSE et al., 2010; KOO et al., 2011). Das espécies do gênero, *L. innocua* é a mais frequente em alimentos contaminados, dificultando a detecção específica das espécies patogênicas (MELDRUM et al., 2010; ZITZ et al., 2011). Desse modo, é interessante distinguir essas espécies. Em imunodiagnósticos, no entanto, anticorpos contra *Listeria* spp. apresentam baixa afinidade e ausência de reação com *L. monocytogenes*, impedindo a detecção rápida (HEO et al., 2007; LIN et al., 2009).

Levando esses aspectos em consideração, recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Aplicada do CDTEC da UFPel desenvolveu anticorpos monoclonais (MAbs) específicos contra InIA. Tal proteína é exclusiva da espécie *L. monocytogenes* e expressa em todas as fases de crescimento, se mostrando um ótimo alvo para imunodiagnósticos (DRAMSI et al., 1993; GLASER et al., 2001; POYART et al., 1996). Esses anticorpos foram caracterizados por diversas técnicas, desde as mais simples, como *Western blot* e imunofluorescência, até as mais complexas, como separação imuno-magnética e biossensores de fibra ótica. Com isso, a especificidade desses MAbs anti-InIA de classe IgG (denominados 3B7 e 2D12) para a identificação de *L. monocytogenes* foi determinada, abrindo

possibilidades para sua aplicação em métodos rápidos de detecção. Além disso, outro MAb, de classe IgM (denominado 3F8), também foi caracterizado. Ele é capaz de reconhecer qualquer espécie do gênero *Listeria*, permitindo avaliar a presença de espécies não patogênicas além das patogênicas (MENDONÇA et al., 2012). Nesse trabalho, a caracterização desses MAbs foi continuada visando, principalmente, suas aplicações em ELISA direto e sanduíche.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver testes diagnósticos para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* utilizando anticorpos monoclonais.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Expressar dois possíveis alvos do MAb 3F8;
- Definir o alvo do MAb 3F8 por *Western blot*;
- Utilizar o alvo de 3F8 para produzir anticorpos monoclonais;
- Avaliar o potencial diagnóstico dos MAbs anti-*L. monocytogenes* (3B7 e 2D12) e anti-*Listeria* spp. (3F8) por ELISA direto e sanduíche.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Definição do alvo do MAb 3F8

As proteínas CodY e FBA foram inicialmente identificadas por espectrometria de massas como possíveis alvos do MAb 3F8 (MENDONÇA et al., 2012). Essas proteínas foram amplificadas do genoma de *L. monocytogenes* ATCC 19114 com oligonucleotídeos desenhados pelo programa *Vector NTI Advance 11* (Invitrogen) e clonadas no vetor pAE de expressão em *E. coli*. Os plasmídeos previamente construídos pAE-*cody* e pAE-*fba* utilizados para transformar, por choque-térmico, as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star e pLysS, respectivamente, sendo cultivados por 18h a 37°C em 20mL de caldo LB contendo 100µg/mL de ampicilina em ambos os cultivos e 25µg/mL de cloranfenicol para o de pLysS. Em seguida, os 20mL foram transferidos para 500mL de LB contendo os mesmos antibióticos, os quais foram cultivados até $DO_{600}=0,5-0,8$, sendo imediatamente induzidas com IPTG para uma concentração final de 0,5mM. O período de expressão foi de 4h, sendo os cultivos centrifugados (16.000g; 4°C; 15min) e suspensos em 20mL de tampão de lise com 100µg/mL de lisozima e incubado por 2h a 4°C. As células foram rompidas e avaliadas quanto à solubilidade do mesmo modo como descrito na seção 2.3.2, com exceção do tampão de solubilização II, que foi utilizado com NLS 0,4%. Os sobrenadantes obtidos foram avaliados em SDS-PAGE 12% e as frações que continham as proteínas rCodY e rFBA foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, GE Healthcare), bloqueada com leite em pó desnatado 5% e reveladas por quimiluminescência (kit *Western blotting substrate*, Thermo Scientific) com anti-His (Sigma Aldrich). A mesma membrana foi incubada a temperatura ambiente por três vezes de 20min com tampão *mild stripping* (glicina 0,2M; SDS 0,1%; Tween-20 10%; pH 2,2) para a retirada dos anticorpos utilizados.

Outra revelação foi feita utilizando o anticorpo monoclonal 3F8 diluído 1:3.000 em PBS-T, o qual foi incubado 1h a temperatura ambiente. Logo, a membrana foi incubada com anti-camundongo conjugado com peroxidase nas mesmas condições e revelado novamente por quimiluminescência.

3.3.2. Expressão e purificação da proteína rFBA

Uma das frações utilizadas na definição do alvo de 3F8 (seção 3.3.1) foi utilizada para purificar a proteína rFBA. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade com Ni^{+2} , em sistema manual, utilizando coluna *HisTrap FF crude* de 1mL (GE Healthcare) e tampão de eluição contendo Imidazole 0,5M. As frações purificadas foram verificadas por SDS-PAGE 12% quanto à presença de rFBA, misturadas, concentradas por difusão em meio com alta concentração de glicose e dialisadas sob agitação em 2L de PBS por 24h a 4°C. O produto da diálise foi quantificado com o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e congelado a -20°C para uso posterior.

3.3.3. Fracionamento de proteínas de *L. monocytogenes* ATCC 19117

A cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19117 (Lm19117), presente na bacterioteca do Laboratório de Imunologia Aplicada, foi esgotada em meio TSA e cultivada a 37°C por 18h. Cerca de 2 colônias eram utilizadas para fazer cada um de dois pré-inóculos de 20mL de meio TSB em tubos de 50mL. Esses pré-inóculos foram incubados em agitador a 37°C por 18h e, logo, inoculados em 200mL de meio TSB em Erlenmeyer estéril. O cultivo foi incubado em agitador a 37°C até atingir DO_{600} de 0,8. Em seguida, foi centrifugado (7.000g; 4°C; 10min), o sobrenadante foi

descartado e o *pellet* cuidadosamente suspenso em 500 μ L de tampão RS (Tris 10mM; SDS 0,5%; pH 6,9). O volume foi transferido para um tubo de 1,5mL, incubado por 30min em banho-maria a 37°C e centrifugado (14.000g; 4°C; 5min). O sobrenadante (fração de parede celular) foi guardado e o *pellet* suspenso em 100 μ L de tampão Lise-B (Tris 100mM; NaCl 100mM; MgCl₂ 10mM), passando por três ciclos de congelamento (10min a -80°C) e descongelamento (5min a 37°C). O tubo foi centrifugado (14.000g; 4°C; 15min) e o sobrenadante (fração citoplasma) guardado. O *pellet* foi suspenso em 200 μ L tampão de amostra 2x (SDS 5%; β -mercaptoetanol 10%; Tris 125mM; glicerol 20%; pH 6.9), sonicado em quatro ciclos de 15 s e centrifugado (14.000g; 4°C; 20min). O sobrenadante (fração membrana) foi misturado à fração citoplasma. Esse mesmo procedimento foi feito utilizando duas colônias da mesma cepa como inóculo em 200mL de TSB-YE, o qual foi cultivado por 18h e processado sem aferir a DO₆₀₀. As frações de parede celular (par. cel.) e da mistura de citoplasma e membrana (cit.-mem.) foram avaliadas quanto à presença de FBA por *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal 3F8, o qual foi incubado por 1h a temperatura ambiente, e, posteriormente, o anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase, incubado nas mesmas condições.

3.3.4. Produção de anticorpos monoclonais

Inoculação de camundongos. Três camundongos Balb/c (6-8 semanas de idade) foram inoculados com combinações proteicas direcionadas para produção de anticorpos monoclonais contra FBA e alvos alternativos de *L. monocytogenes*. A primeira imunização foi formulada com Adjuvante de Freund Completo (AFC) e as demais com Incompleto (AFI), ambos diluídos 1:2 com soluções contendo quantidade apropriada de antígeno. O intervalo entre as doses foi de 7 dias, com

exceção do intervalo entre a primeira e a segunda, que foi de 14 dias. As três primeiras doses foram iguais para os três camundongos, consistindo em 100µg da proteína rFBA. A partir da quarta dose, um camundongo foi sempre inoculado com 50µg de rFBA, enquanto os outros dois receberam combinações de rFBA com 50µg de componentes celulares – fração de citoplasma e membrana (cit.-mem.) ou fração de parede celular (par. cel.) – de *L. monocytogenes* ATCC 19117. Após 8 inoculações via intraperitoneal, os soros dos 3 camundongos foram titulados e um deles foi escolhido para a realização da fusão. Por isso, apenas um animal recebeu uma nona inoculação, consistindo de 100µg de rFBA via intraperitoneal e 50µg via intravenosa. A tab. 1 resume as formulações das proteínas inoculadas em cada um dos 3 camundongos.

Tabela 1. Resumo das formulações de rFBA inoculadas nos camundongos para a produção de MAbs.

Injeção (dia)	Antígeno	Adjuvante	Via	Camundongo
1 ^a (zero)	100µg rFBA	AFC	i.p.	C1, C2 e C3
2 ^a (14)	100µg rFBA	AFI	i.p.	C1, C2 e C3
3 ^a (21)	100µg rFBA	AFI	i.p.	C1, C2 e C3
4 ^a (28)	50µg rFBA + 50µg Lm19117 cit.-mem.	AFI	i.p.	C1 e C2
	50µg rFBA	AFI	i.p.	C3
5 ^a (35)	50µg rFBA + 50µg Lm19117 par. cel.	AFI	i.p.	C1 e C2
	50µg rFBA	AFI	i.p.	C3
6 ^a (42)	50µg rFBA + 50µg Lm19117 par. cel.	AFI	i.p.	C1 e C2
	50µg rFBA	AFI	i.p.	C3
7 ^a (49)	50µg rFBA + 50µg Lm19117 par. cel.	AFI	i.p.	C1 e C2
	50µg rFBA	AFI	i.p.	C3
8 ^a (56)	50µg rFBA + 50µg Lm19117 cit.-mem.	AFI	i.p.	C1 e C2
	50µg rFBA	AFI	i.p.	C3
9 ^a (65)	100µg rFBA/50µg rFBA	AFI/sem	i.p./i.v.	C1

Lm19117, *L. monocytogenes* cepa ATCC 19117; cit.-mem., fração proteica de citoplasma e membrana; par. cel., fração proteica de parede celular; AFC, adjuvante de Freund completo; AFI, adjuvante de Freund incompleto; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenosa; C1, camundongo 1; C2, camundongo 2; C3, camundongo 3.

Avaliação de resposta imune por ELISA. Para avaliar a resposta imunológica humoral dos camundongos inoculados, ELISAs foram feitos após algumas aplicações dos antígenos. Para isso, o sangue de cada um dos camundongos foi extraído pelo plexo retro-ocular utilizando pipetas Pasteur e condicionado em tubos de microcentrifuga. O sangue foi incubado 15min a 37°C e centrifugado por 7min; 5.000rpm. O sobrenadante, correspondente ao soro do animal, foi coletado e utilizado em ELISA. Foram feitos ELISAs dos soros dos 3 camundongos 6 dias após a terceira e quinta inoculações. Esses testes foram feitos em placas de 96 cavidades (Cralplast) sensibilizadas com 100ng de rFBA ou 200ng das frações cit.-mem. e parede celular. Após a oitava inoculação, os soros foram titulados através de diluições seriadas com base 2, de 1:100 até 1:819.200. Um soro pré-imune de camundongo (SPI, 1:100 ou 1:500) e o MAb 3F8 purificado (1:3.000) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) foi utilizado como secundário e a revelação feita com solução contendo o substrato (H_2O_2) e o cromógeno OPD (o-fenilenodiamina diidrocloreto). Antes da leitura em espectrofotômetro (Thermo Plate) com absorvância de 450nm (A_{450}), a placa ficou 15min a temperatura ambiente sob proteção da luz. Os antígenos utilizados foram adsorvidos com tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7), as diluições de anticorpos primários e secundários foram feitas em PBS + Tween 0,05% (v/v) (PBS-T) e a solução reveladora preparada em tampão fosfato-citrato 0,1M (pH 4,0). Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de PBS-T.

Fusão de esplenócitos com células SP_2 . Após a escolha do camundongo a ser abatido, procedeu-se o protocolo de fusão de acordo com os procedimentos padrões utilizados no Laboratório de Imunologia Aplicada do CDTec da UFPel, os

quais são adaptados de Harlow e Lane (1998). Basicamente, o camundongo foi eutanasiado por deslocamento cervical e teve seu baço removido. O baço foi macerado e lavado com meio DMEM incompleto e ciclos de centrifugação por 8min a 1.000rpm. Em seguida, 5 garrafas de 75cm² de células SP₂ em confluência de 80-90% foram preparadas. Para isso, o meio de cultura foi removido por centrifugação e as células contadas em câmara de Neubauer com a mistura de Azul de Tripán. Após a contagem, as células de baço foram misturadas com as SP₂. Para a fusão propriamente dita, a mistura das duas células passou por incubação a 37°C, sendo posteriormente misturada com Polietilenoglicol (PEG) 50% (p/v) *Hybri Max* (Sigma Aldrich) e agitada com movimentos circulares. Finalmente, as células foram centrifugadas (8min; 1.000rpm), suspensa em 10mL de meio HAT-20 e colocadas em 5 placas de cultivo de 96 cavidades com 100µL em cada. As placas tiveram metade de seu meio trocado (100µL) com HAT-20 por duas vezes nos dias 5 e 8 após a fusão. Infelizmente, o procedimento não pode ser continuado devido a uma contaminação severa no último meio de cultura trocado.

O soro após a oitava dose do animal foi utilizado para determinar a quantidade ideal de rFBA para a triagem de anticorpos monoclonais por ELISA. Além disso, o soro coletado no dia da fusão também foi testado na diluição de 1:1.000. Nesse ensaio, uma placa de ELISA (Cralplast) foi sensibilizada com 100ng de rFBA diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7) por poço. Não houve etapa de bloqueio, sendo a placa incubada 1h a 37°C com diluições seriadas de base 2 do soro pós-oitava dose, de 1:400 a 1:51.200 em PBS-T. Em seguida, a placa foi incubada com anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) por 1h a 37°C. A revelação foi feita em tampão fosfato-citrato 0,1M (pH 4,0) contendo H₂O₂ e OPD como já descrito. Um soro pré-imune de

camundongo (SPI) e o MAb 3F8 diluído 1:3.000 em PBS-T serviram como controles negativo e positivo, respectivamente. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de PBS-T.

3.3.5. Purificação dos anticorpos monoclonais 3F8, 3B7 e 2D12

Os anticorpos a serem testados – 3F8 (anti-FBA), 3B7 e 2D12 (anti-InIA) – foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A (GE Healthcare). Para isso, 1mL de ascite liofilizada foi suspenso em 5mL de tampão de lavagem (fosfato dissódico 20mM; pH 7,0). A coluna foi adaptada em uma bomba peristáltica, a qual foi lavada com tampão de lavagem. Em seguida, a amostra de ascite foi passada lentamente, sendo seu último 1mL aferido em espectrofotômetro 280nm. Novamente, a coluna foi lavada com tampão de lavagem até que a absorbância da coleta fosse próxima de zero (0-0,03). O tampão de eluição (glicina 0,1M; pH 2,6) foi utilizado para troca de pH. As frações foram coletadas em alíquotas de 1mL, sendo utilizado 200 μ L de tampão Tris-HCl 1M (pH 9,0) para estabilizar o pH das eluições. A concentração de anticorpos foi aferida pela determinação de absorbância em 280nm (A_{280}) utilizando os coeficientes de extinção molar para IgM (1,18 para 3F8) e IgG (1,35 para 3B7 e 2D12). Para conferir a integridade da molécula de IgM, o MAb 3F8 foi verificado em SDS-PAGE 12%.

3.3.6. Cultivo das bactérias

As bactérias utilizadas foram *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* SC (isolado local), *L. innocua*, *L. seeligeri* e *Salmonella* Enteritidis. Essas bactérias foram inoculadas em 10mL de meio TSB-

YE, 16h a 37°C. Os cultivos foram centrifugados (2.600g; 7min; 4°C) e, posteriormente, o *pellet* foi lavado duas vezes com 10mL de salina tamponada com fosfato (PBS 1X), nas mesmas condições anteriores. Ao final, o *pellet* foi suspenso com tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,7), para o ELISAs indireto e direto, ou com PBS-T, para o ELISA sanduíche, sendo ajustado para $DO_{600}=1,0$.

3.3.7. ELISA indireto

Placas de 96 cavidades (Cralplast) foram sensibilizadas com 100 μ L das bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* SC (isolado local), *L. innocua*, *L. seeligeri* e *S. Enteritidis* ajustadas para $OD_{600}=1,0$ com tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7). As proteínas rFBA e rInIA também foram sensibilizadas com 100ng por cavidade, servindo como controles positivos da reação dos anticorpos. Essa etapa foi feita por 16h a 4°C e o bloqueio com leite em pó desnatado 5% diluído em PBS-T por 1h a 4°C. Em seguida, os MAbs purificados foram diluídos 1:500 em PBS-T e incubados 1h a 37°C. A revelação foi feita com anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich), o qual foi incubado por 1h a 37°C, e com solução contendo H_2O_2 e OPD como já descrito. Um soro pré-imune de camundongo (SPI) e um soro policlonal anti-*Listeria*, ambos diluídos 1:500, foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, para a presença de bactéria na placa. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada três vezes com 200 μ L de PBS-T.

3.3.8. Marcação e titulação dos anticorpos monoclonais com peroxidase

Os anticorpos monoclonais 3B7, 2D12 e 3F8 foram marcados com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) de acordo com protocolo descrito por BURNS (2004). Brevemente, 2mg da enzima foram dissolvidos em 500 μ L de água ultra pura estéril. Em seguida, adicionou-se 100 μ L de periodato de sódio 0,1M na solução com a peroxidase, a qual foi agitada por 20min à temperatura ambiente sob proteção da luz. Em seguida, a enzima foi dialisada contra o tampão acetato de sódio 1mM, pH 4,4 por 16h a 4°C sob agitação. Em seguida, 10 μ L de tampão carbonato de sódio 0,2M (pH 9,7) foi adicionado ao produto da diálise. Essa solução com peroxidase foi misturada com 1mL do tampão carbonato de sódio 10mM (pH 9,5) com 4mg do MAb (3F8 ou 3B7 ou 2D12), a qual foi agitada por 2h à temperatura ambiente sob proteção da luz. Por fim, adicionou-se 50 μ L de tetraborato de sódio 0,4% (p/v) na solução, a qual ficou sob agitação por mais 2h a 4°C. Os MAbs marcados foram congelados a -20 °C até o uso.

A titulação dos MAbs foi feita sensibilizando uma placa de 96 poços (Cralplast) com 100ng de rFBA e rInIA por cavidade. A sensibilização foi feita em tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7) por 16h a 4°C. Não houve etapa de bloqueio, sendo os anticorpos marcados diluídos 1:100 até 1:25.600 em PBS-T e incubados 1h a 37°C. Logo, o anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) foi incubado por 1h a 37°C e o ELISA revelado com solução contendo H₂O₂ e OPD como já descrito. Um soro pré-imune de camundongo (SPI, diluído 1:100) foi utilizado como controle negativo. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de PBS-T.

3.3.9. ELISA direto

A realização do ELISA direto foi feita em 4 etapas. Cada uma delas é uma tentativa de melhorar a qualidade dos resultados de detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. O primeiro ELISA foi sensibilizado com as bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* SC ajustadas para $DO_{600}=1,0$ com tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7) por 1h a 37°C. As proteínas rFBA e rInIA (100ng por poço) também foram sensibilizadas, servindo como controles positivos da reação dos MAbs. As placas foram bloqueadas com 100µL de leite em pó 5% (p/v) diluído em PBS-T por 1h a 4°C. Um soro policlonal anti-*Listeria* e outro pré-imune de camundongo (SPI), ambos diluídos 1:500 em PBS-T, foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Esses foram adicionados e incubados 1h a 37°C enquanto as outras cavidades ficaram com 100µL de PBS-T. Em seguida, os MAbs marcados com peroxidase, diluídos 1:200 em PBS-T foram incubados 1h a 37°C. Nos controles, foi adicionado anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich). A revelação foi procedida com solução contendo H₂O₂ e OPD como já descrito. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de PBS-T.

O segundo ELISA envolveu o uso das bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. seeligeri*, *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* SC, bem como dos controles com rFBA e rInIA. A sensibilização foi feita por 1h a 37°C, seguida de bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 3% (p/v) diluída em PBS-T por 1h a 37°C. Com exceção do bloqueio, as demais etapas foram iguais ao do primeiro ELISA.

No terceiro ELISA, foram sensibilizadas as bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* e *S. Enteritidis*. Diferente do segundo, o bloqueio foi feito com BSA

2%. No quarto ELISA, essas mesmas bactérias foram utilizadas, sendo o bloqueio realizado com BSA 2% diluída em PBS ao invés de PBS-T.

3.3.10. ELISA sanduíche

Para o ELISA sanduíche, foi utilizada uma placa de 96 poços (Cralplast), a qual foi sensibilizada com 0,5 e 1µg de cada um dos MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 diluídos em 100µL de tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7) por 16h a 4°C. O bloqueio foi feito com BSA 2% diluído em PBS-T por 1h a 37°C. Em seguida, 100µL das bactérias diluídas para $DO_{600}=1$ em PBS-T foram adicionados e incubados 1h a 37°C. Finalmente, os MAbs conjugados com peroxidase, diluídos 1:200 em PBS-T, foram incubados por 1h a 37°C. A revelação foi procedida com solução contendo H_2O_2 e OPD como já descrito. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de PBS-T.

3.4. Resultados

3.4.1. Determinação do alvo do MAb 3F8

Após a utilização dos tampões de lise e de solubilização I, II e III, verificou-se que a maior parte de ambas as proteínas rCodY e rFBA são obtidas na fração contendo NLS 0,2% (Fig. 8A). As frações que contêm essas proteínas foram utilizadas em *Western blot* revelado com anti-His e com o MAb 3F8, respectivamente (Fig. 8B e 8C). Assim, determinou-se que o alvo do MAb 3F8, produzido no Laboratório de Imunologia Aplicada do CDTec da UFPel, é a proteína FBA.

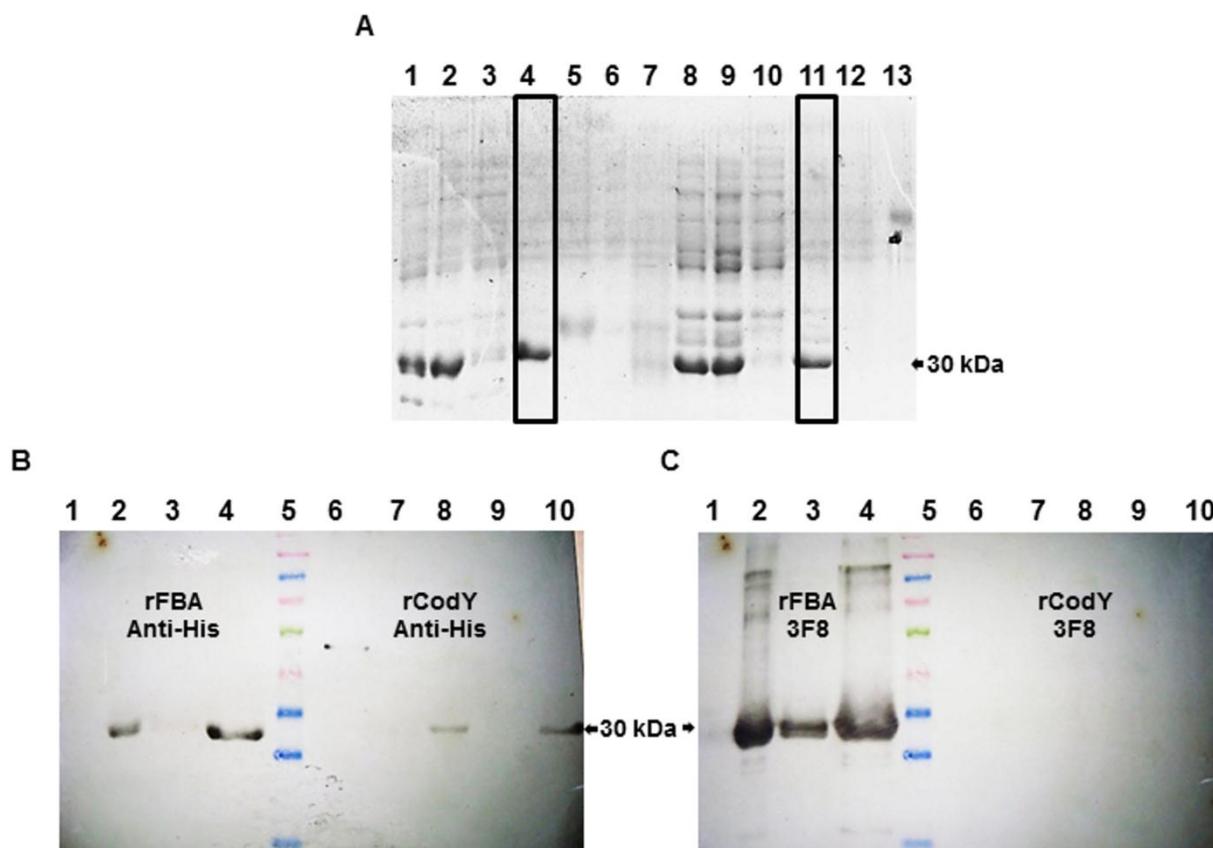


Figura 8 – SDS-PAGE 12% e *Western blot* dos dois possíveis alvos de 3F8. **(A)** Eletroforese das expressões de rFBA em *E. coli* pLysS e rCodY em *E. coli* Star. 1- *E. coli* pLysS/pAE-*fba* não induzida; 2- *E. coli* pLysS/pAE-*fba* induzida; 3- sobrenadante tampão de lise rFBA; 4- sobrenadante tampão de solubilização I rFBA; 5- sobrenadante tampão de solubilização III rFBA; 6- SEM AMOSTRA; 7- Extrato *E. coli* Star; 8- *E. coli* Star/pAE-*cody* não induzida; 9- *E. coli* Star/pAE-*cody* induzida; 10- sobrenadante tampão de lise rCodY; 11- sobrenadante tampão de solubilização I rCodY; 12- sobrenadante tampão de solubilização III rCodY; 13- BSA 1,5µg. Marcadas em preto estão as canaletas com as proteínas solubilizadas em NLS 0,2%. **(B e C)** *Western blot* anti-His e 3F8, respectivamente, dos dois possíveis alvos de 3F8. A mesma membrana foi utilizada para a reação com os dois anticorpos. 1- Extrato *E. coli* pLysS; 2- *E. coli* pLysS/pAE-*fba* induzida; 3- sobrenadante tampão de lise/rFBA; 4- sobrenadante tampão de solubilização I/rFBA; 5- marcador pré-corado (Thermo Scientific); 6- controle positivo anti-His (50kDa); 7- Extrato *E. coli* Star; 8- *E. coli* Star/pAE-*cody* induzida; 9- sobrenadante tampão de lise/rCodY; 10- sobrenadante tampão de solubilização I/rCodY.

3.4.2. Avaliação da solubilidade da proteína rFBA

A maior parte da proteína rFBA é expressa parcialmente solúvel, sendo obtida com a utilização de NLS 0,2% e 0,4% (Fig. 9A e 9B). Assim, foi procedida purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺² para posterior diálise (Fig. 9C).

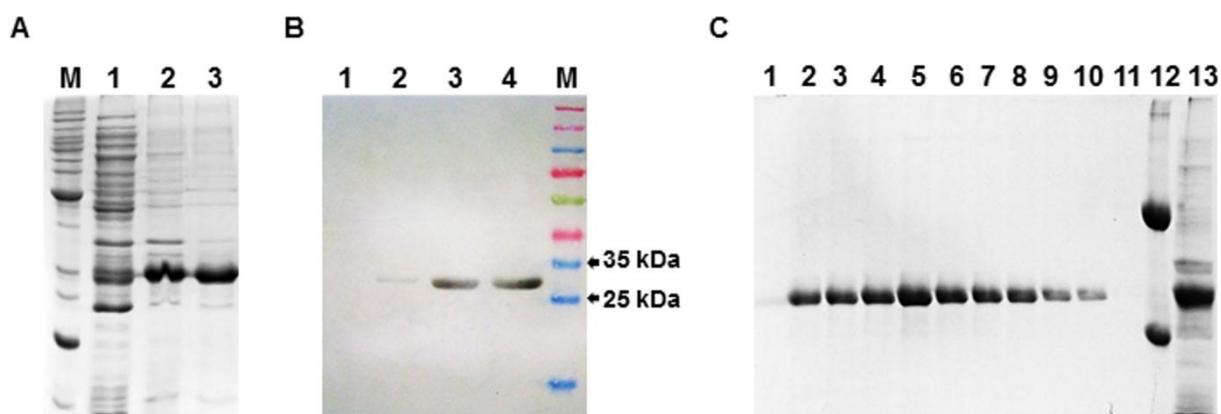


Figura 9 – Análise da solubilidade e purificação de rFBA por SDS-PAGE 12%. **(A)** SDS-PAGE 12% das suspensões resultantes da solubilização. **M**- Marcador *Bench Mark* (Invitrogen); **1**- sobrenadante tampão de lise; **2**- sobrenadante tampão de solubilização I; **3**- sobrenadante tampão de solubilização II. **(B)** *Western blot* anti-His das frações contendo rFBA. **1**- Extrato *E. coli* pLysS (C-); **2**- sobrenadante tampão de lise; **3**- sobrenadante tampão de solubilização I; **4**- sobrenadante tampão de solubilização II; **M**- marcador pré-corado (Thermo Scientific). **(C)** SDS-PAGE 12% da purificação de rFBA. **1**- lavagem purificação; **2-10**- eluições de rFBA; **11**- lavagem após eluição; **12**- MAb IgG (50 e 25kDa); **13** - sobrenadante tampão de solubilização I após passagem na coluna.

3.4.3. Análise das frações proteicas de *L. monocytogenes* ATCC 19117 quanto à presença de FBA

Duas extrações proteicas do cultivo de *L. monocytogenes* ATCC 19117 sem DO₆₀₀ ajustada foram avaliadas por *Western blot* utilizando 3F8 como anticorpo

primário. Nessa primeira análise, apenas as frações de cit.-mem. apresentaram a proteína FBA (Fig. 10A).

Em outra extração, as frações proteicas foram obtidas de um cultivo de 18h, diretamente, e de outro com OD_{600} ajustada para 0,8. Desse modo, foi possível observar que a proteína FBA é presente em todas as frações obtidas (Fig. 10B). Ainda, é possível observar que maiores quantidades de FBA foram obtidas quando a OD_{600} foi ajustada para 0,8. Tais resultados indicam que a FBA é presente em maior quantidade na parede celular de *L. monocytogenes* quando ela se encontra em fase *log* de crescimento e em menor quantidade durante a fase estacionária.

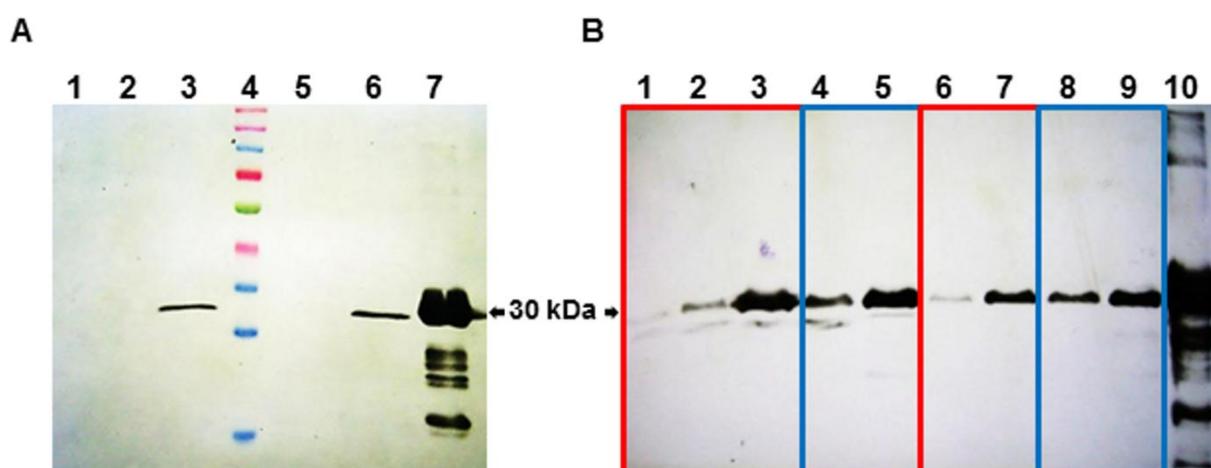


Figura 10 – *Western blot* com 3F8 das frações celulares de *L. monocytogenes* ATCC 19117 (Lm19117). **(A)** Extração das frações de parede celular, citoplasma e membrana sem DO_{600} ajustada. 1- proteína 32kDa (C-); 2- Lm19117 par. cel.; 3- Lm19117 cit.-mem.; 4- marcador pré-corado (Thermo Scientific); 5- Lm19117 par. cel. 6- Lm19117 cit.-mem.; 7- rFBA (C+). **(B)** Comparação das extrações proteicas de Lm19117 sem (wo, caixa vermelha) e com (w, caixa azul) a DO_{600} ajustada para 0,8. 1- Lm19117 par. cel. wo; 2- Lm19117 cit. wo; 3- Lm19117 mem. wo; 4- Lm19117 par. cel. w; 5- Lm19117 cit. w; 6- Lm19117 par. cel. wo dialisada; 7- Lm19117 cit.-mem. wo dialisada; 8- Lm19117 par. cel. w dialisada; 9- Lm19117 cit.-mem. w dialisada; 10- rFBA (C+).

3.4.4. Monitoramento da resposta imune de camundongos imunizados com rFBA

A análise dos três camundongos imunizados por ELISA, após a terceira e quinta imunizações, mostra que a resposta contra a proteína rFBA manteve A_{450} próxima de 1,0 utilizando diluição 1:1.000 (Fig. 11A e 11B). Antes de realizar a fusão das células do baço de um dos camundongos, seus soros foram titulados. Essa titulação sugeriu que o camundongo 1 (C1) tinha níveis maiores de anticorpos que os demais (C2 e C3) em menores diluições (Fig. 11C). Após a fusão do baço de C1, seu soro após a oitava inoculação foi utilizado para determinar a melhor quantidade da proteína rFBA a ser aplicada nos ELISAs de triagem de anticorpos monoclonais. Assim, determinou-se que 250ng por cavidade de rFBA apresenta melhores sinais quando maiores diluições são utilizadas. Ainda, o soro coletado antes da fusão foi avaliado quanto à soroconversão após a inoculação intravenosa, mostrando que sua diluição 1:1.000 foi aproximadamente 0,2 unidades de A_{450} maior que a diluição 1:800 do coletado após a oitava imunização (Fig. 11D).

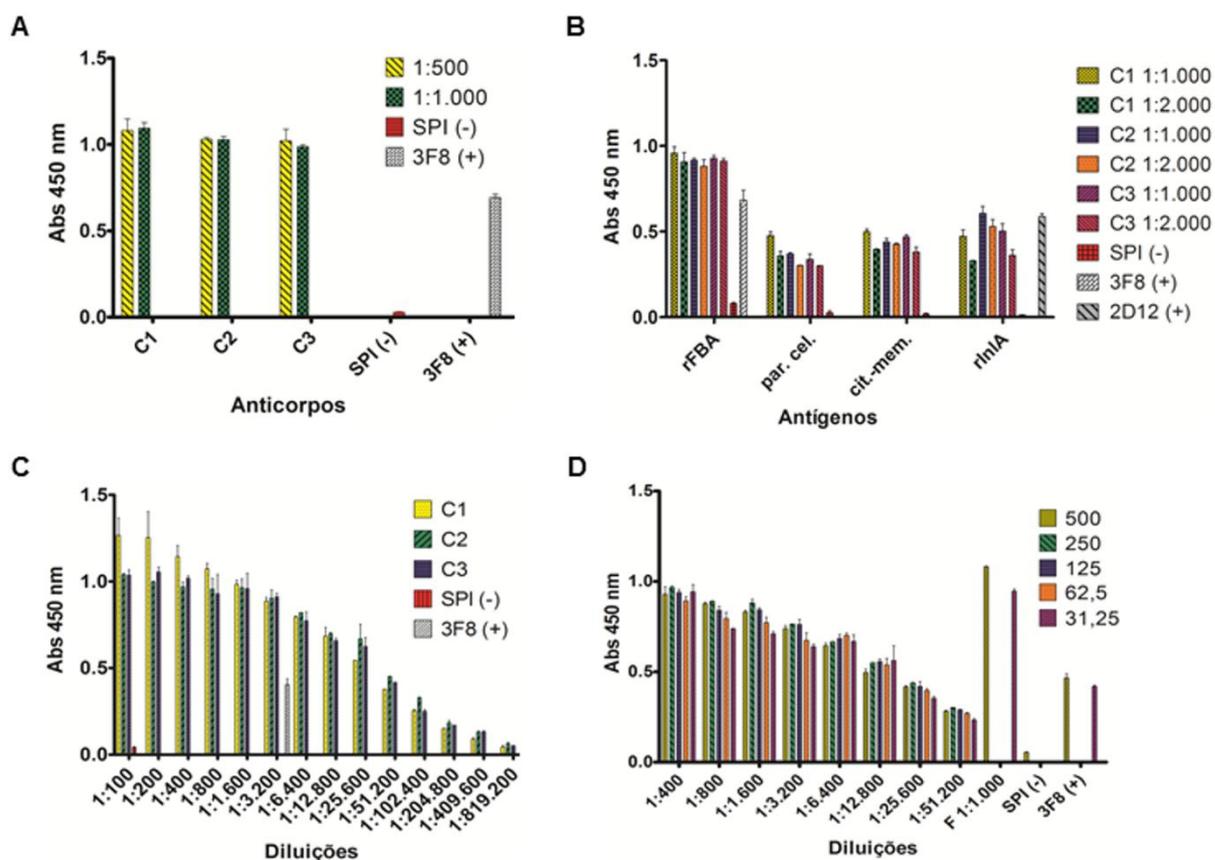


Figura 11 – ELISA para avaliação da resposta humoral de três camundongos (C1, C2 e C3) contra rFBA para a produção de MAb. **(A)** ELISA após a terceira inoculação. **(B)** ELISA após a quinta inoculação. **(C)** ELISA de titulação após a oitava inoculação. Dos três camundongos, o C1 foi escolhido para fazer a fusão do baço. **(D)** ELISA para determinação da melhor quantidade de rFBA para a triagem de MAb. Das 5 quantidades testadas (500; 250; 125; 62,5; e 31,25ng por poço), escolheu-se a que continha 250ng de rFBA, pois apresentou reações melhores.

Os esplenócitos fusionados com as células SP₂ foram cultivados até o nono dia após o procedimento de fusão. Aparentemente, existiam hibridomas na maioria das cavidades da placa de cultivo. No entanto, após a segunda troca de meio de cultura, ao vigésimo dia pós-fusão, todas as cinco placas apresentaram altos níveis de contaminação, o que determinou o descarte desse material.

3.4.5. Purificação dos MAbs 3F8, 3B7 e 2D12

O MAb 3F8 purificado foi avaliado em SDS-PAGE 12%, indicando baixo rendimento em sua purificação quando comparado com os dos IgG 3B7 e 2D12. No entanto, suas frações se apresentavam íntegras (Fig. 12A). Já os MAbs 3B7 e 2D12 apresentaram rendimento maior que 3F8, apresentando A_{280} maiores que 1,5 (Fig. 12B). Esses anticorpos foram utilizados nos ELISAs posteriores.

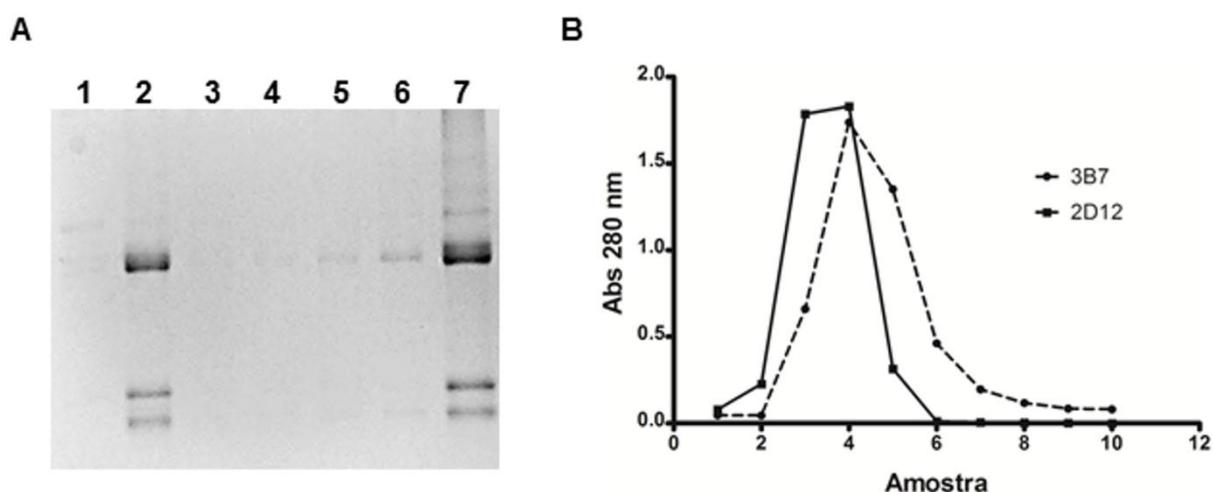


Figura 12 – Purificação dos MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 por cromatografia em coluna de proteína A (GE Healthcare). **(A)** SDS-PAGE 12% da purificação de 3F8. **1-6-** eluições 3F8; **7-** 3F8 puro. **(B)** Espectrofotometria a 280nm da purificação de 3B7 e 2D12. As amostras 3-7 de 3B7 foram misturadas e dialisadas. O mesmo foi feito com as amostras 2-5 de 2D12.

3.4.6. ELISA indireto

O ELISA indireto mostrou que os anticorpos purificados apresentavam atividade. Além disso, foi possível notar que os anticorpos apresentavam o padrão esperado de detecção. Isso porque 3F8 foi capaz de distinguir as cepas de *Listeria* spp. da de *S. Enteritidis*. Ainda, os MAbs 3B7 e 2D12 mostraram capacidade de distinguir as cepas patogênicas – *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 19117 – das não

patogênicas (*L. innocua* e *L. seeligeri*) (Fig. 13). A coerência desses resultados determinou o avanço do teste desses MAbs em ELISA direto.

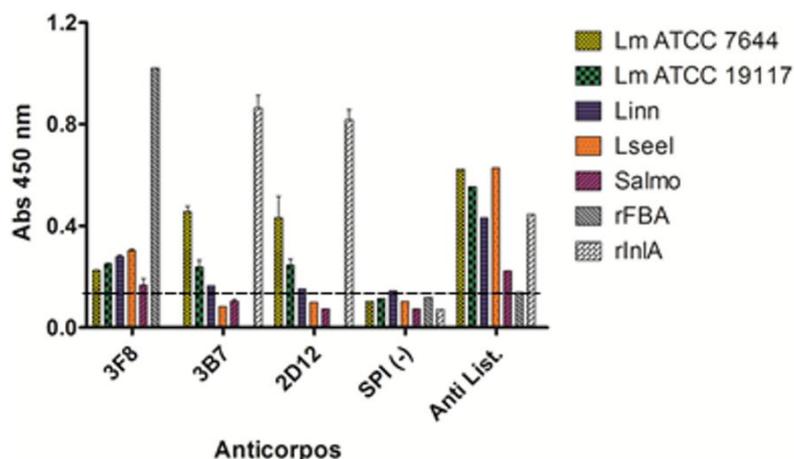


Figura 13 – Avaliação dos MAbs purificados por ELISA indireto. Os MAbs purificados foram avaliados quanto suas reações com as bactéria *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644 e ATCC 19117, *L. innocua* (Linn), *L. seeligeri* (Lseel) e *S. Enteritidis* (Salmo). As proteínas-alvo recombinantes rFBA e rInIA foram utilizadas como controle positivo. O soro pré-imune (SPI) serviu de controle negativo, enquanto o soro anti-*Listeria* (Anti. List.) foi utilizado para confirmar a presença de bactérias no ensaio. A linha preta tracejada indica a média da maior reação do controle negativo feito com SPI.

3.4.7. Titulação dos MAbs marcados e desenvolvimento de ELISA direto

Após a conjugação dos MAbs com a enzima peroxidase (Sigma Aldrich), eles foram titulados para avaliar melhores concentrações de uso em ELISA direto (Fig. 14). Feito isso, foi possível determinar que os MAbs 3B7 e 2D12 apresentaram reações positivas até a diluição de 1:25.600, uma vez que foram superiores às do controle negativo com SPI. Já 3F8 apresentou reação semelhante a essas na diluição de 1:6.400, indicando menor quantidade de anticorpos marcados. Apesar dessa titulação, uma concentração maior de todos os MAbs (1:200) foi utilizada nos

ELISAs diretos com bactérias, uma vez que a acessibilidade das proteínas nas células é menor.

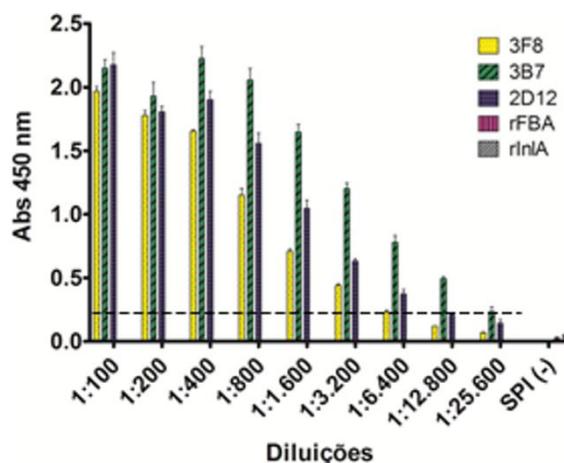


Figura 14 – ELISA para titulação dos MAb conjugados com peroxidase. Os MAb marcados com a enzima peroxidase foram titulados frente a suas respectivas proteínas-alvo (rFBA, para 3F8, e rInIA, para 3B7 e 2D12). A linha preta tracejada indica a maior média de absorvância da diluição 1:25.600, relativa ao MAb 3B7.

O primeiro ELISA direto mostrou que 3F8 distinguiu *Listeria* spp. de *S. Enteritidis*, mostrando A_{450} aproximadamente três vezes maiores. Os MAb 3B7 e 2D12 também foram eficientes na distinção de *L. monocytogenes* das demais, uma vez que essa espécie apresentou A_{450} , pelo menos, 2 vezes maiores que as demais. No entanto, algumas reações inespecíficas de 3B7 e 2D12, principalmente com *L. seeligeri*, indicava reações cruzadas (Fig. 15A).

O segundo ELISA foi feito na tentativa de diminuir possíveis reações inespecíficas dos MAb 3B7 e 2D12. Usando o bloqueio com BSA 3%, as reações inespecíficas de 3B7 e 2D12 foram consideravelmente diminuídas. Ainda, as A_{450} de *L. monocytogenes* se mostraram, pelo menos, sete vezes maiores que para as demais espécies. Contudo, o controle positivo da reação de 3F8 diminuiu consideravelmente, sendo aproximadamente dez vezes menor que o primeiro

ELISA, pouco maior (cerca de 0,025 unidade de A_{450}) que a reação de *L. monocytogenes* SC e 0,23 unidades menor que a reação com *L. monocytogenes* ATCC 19117 (Fig. 15B).

Para o terceiro ELISA, apenas a concentração de BSA para o bloqueio foi alterada. Utilizando BSA 2% em PBS-T, a reação do controle positivo de 3F8 foi recuperada. Entretanto, as reações inespecíficas dos 3 MAbs voltaram a prejudicar a qualidade do teste, principalmente pelas reações de SPI, que foram cerca de três vezes maiores que os testes anteriores. Além disso, a reação dos controles positivos de 3B7 e 2D12 – foi aproximadamente três vezes menores que os outros ELISAs – indicam que esse procedimento prejudicou a reação do ensaio (Fig. 15C).

O quarto e último ELISA direto foi novamente modificado em seu bloqueio. BSA 2% diluída em PBS foi usada em vez de diluída em PBS-T. Nesse ensaio, foram encontrados os melhores resultados, uma vez que 3F8 foi capaz de distinguir *Listeria* spp. de *S. Enteritidis*, apresentando A_{450} cerca de quatro vezes maiores. 3B7 e 2D12 continuaram distinguindo *L. monocytogenes* das demais espécies, mas, desta vez, as reações inespecíficas com as outras espécies foram eliminadas, já que suas A_{450} são praticamente idênticas às do SPI. Além disso, os controles positivos mostraram valores satisfatórios, ficando com A_{450} acima de 1,5. A única ressalva desse ensaio foi o baixo valor de reação de 3F8 com *L. monocytogenes* ATCC 7644, o qual foi em torno de cinco vezes menor que as reações de 3B7 e 2D12 com a mesma cepa e em torno de 3,5 vezes menor que as reações de 3F8 com *L. innocua*. Essa diferença de reação com os diferentes MAbs, sugere uma adaptação quanto ao cultivo dessa cepa de modo a propiciar a expressão da proteína-alvo FBA (Fig. 15D).

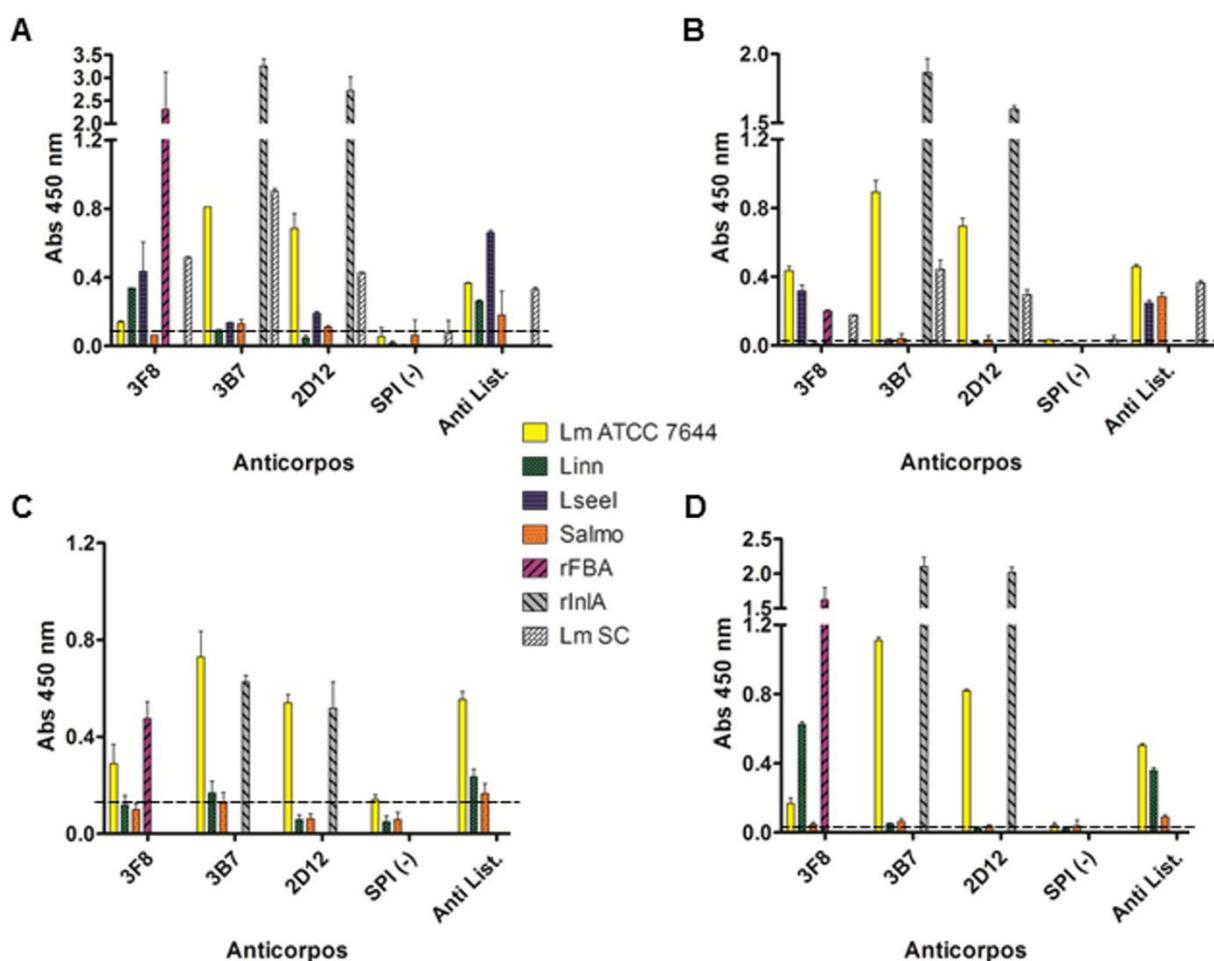


Figura 15 – Desenvolvimento de ELISA direto utilizando os MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 conjugados com peroxidase. Ao centro da imagem, estão as legendas das bactérias e antígenos utilizados: *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. innocua* (Linn), *L. seeligeri* (Lseel), *S. Enteritidis* (Salmo) e *L. monocytogenes* SC (isolado local). O soro pré-imune (SPI) serviu de controle negativo, enquanto o soro anti-*Listeria* (Anti. List.) foi utilizado para confirmar a presença de bactérias no ensaio. **(A)** Primeiro ELISA, indicando reações inespecíficas com *L. seeligeri*. **(B)** Segundo ELISA, onde o controle positivo 3F8 apresentou reações muito baixas. **(C)** Terceiro ELISA, no qual o bloqueio foi modificado e as reações inespecíficas voltaram a aparecer. **(D)** Quarto ELISA, onde o bloqueio foi melhorado, resultando em altas reações dos controles e baixas reações inespecíficas. A linha preta tracejada indica a média da maior reação do controle negativo feito com SPI.

3.4.8. ELISA sanduíche

Para os três MAb's utilizados, foi possível observar reações inespecíficas com *S. Enteritidis*, com A_{450} variando de 0,07-0,28. Entretanto, todos conseguiram distinguir seus alvos usando a média das absorbâncias. No caso do 3F8, a sensibilização com 0,5 μ g foi capaz de diferenciar as reações com *Listeria* spp. das com *S. Enteritidis*, apresentando A_{450} cerca de duas vezes maiores. Essa quantidade de MAb foi melhor que o uso de 1 μ g, que não teve tal capacidade de distinção. Nas reações de 3B7, o uso de 0,5 μ g apresentou grande desvio padrão, bem como reações inespecíficas com *L. innocua* ($A_{450}\approx 0,34$), as quais foram semelhantes às de *L. monocytogenes* ($A_{450}\approx 0,36$). Já a utilização de 1 μ g de 3B7 resultou na diminuição tanto dessa reação com *L. innocua* quanto dos desvios padrão, mostrando diferença de A_{450} de aproximadamente duas vezes entre as duas espécies de *Listeria*. Assim como para as reações de 3B7, as de 2D12 se mostraram melhores com a utilização de 1 μ g. Isso porque as reações com *L. monocytogenes* foram aproximadamente 0,08 unidades de A_{450} maiores que as resultantes da utilização de 0,5 μ g. Além disso, essa reação de 1 μ g com *L. monocytogenes* se mostrou em torno de três vezes maior que para *L. innocua* e *S. Enteritidis*, mantendo a distinção da espécie patogênica (Fig. 16).

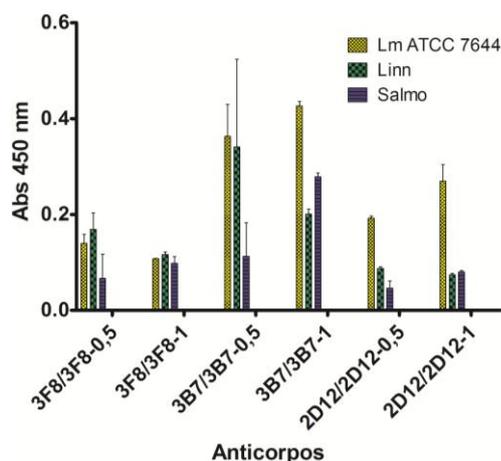


Figura 16 – Testes da quantidade dos anticorpos 3F8, 3B7 e 2D12 para realizar a captura do ELISA sanduíche. O ensaio foi realizado com as bactérias *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. innocua* (Linn) e *S. Enteritidis* (Salmo). Apesar das reações inespecíficas com Linn e Salmo, as quantidades de 0,5µg de 3F8 e 1µg de 3B7 ou 2D12 mostraram resultados promissores.

3.5. Conclusões e perspectivas

A proteína FBA, presente em *Listeria* spp. é um excelente alvo para a detecção desse gênero, uma vez que esse alvo é abundante nas células de *L. monocytogenes*. Estudos quanto ao perfil de expressão desse alvo são de interesse, uma vez que o presente trabalho traz um indício de que FBA é expressa em diferentes níveis de acordo com o estágio de crescimento bacteriano. Desse modo, técnicas de detecção utilizando o MAb 3F8 poderiam ser aprimoradas ao utilizar cultivos previamente caracterizados. Esse MAb, específico contra FBA, vir a ser uma excelente ferramenta na detecção de *Listeria* spp.. Contudo, algumas características de seu isotipo (IgM) limitam sua aplicação em ensaios diagnósticos avançados bem como a qualidade de resultados em técnicas como o ELISA, o que foi notado ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Por isso, nosso grupo iniciou os procedimentos de produção de anticorpos monoclonais em camundongos visando à

produção de um anticorpo IgG específico contra a FBA. Esse objetivo ainda será trabalhado de modo a caracterizar outros MAbs específicos contra *Listeria* spp. ou *L. monocytogenes*.

Os MAbs 3F8, 3B7 e 2D12 mostraram grande aplicabilidade em ensaios de ELISA após sua conjugação com peroxidase. O desenvolvimento do ELISA direto mostrou resultados animadores, indicando que esses anticorpos são eficientes na detecção tanto de *Listeria* spp. quanto de *L. monocytogenes*. O ELISA sanduíche mostrou resultados animadores quando 0,5µg de 3F8 e 1µg de 3B7 ou 2D12 é utilizado para captura, sendo necessários alguns ajustes quanto as reações inespecíficas. Sendo assim, nosso grupo ampliará as cepas e espécies testadas por esses ensaios, ampliando as informações da aplicação desses MAbs em ambas as técnicas. Ainda, os resultados já obtidos mostram que esses anticorpos podem ser aplicados em outras metodologias diretas, como *Western blot*, *dot blot*, imunohistoquímica etc., permitindo maior facilidade de execução.

4. Atividades Extras

4.1. Construção e expressão de uma nova proteína para o desenvolvimento de vacina e/ou teste diagnóstico para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

4.1.1. Introdução

O *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* é uma bactéria Gram negativa e microaerófila capaz de habitar o sistema reprodutor de bovinos. Ela é presente principalmente nos machos, onde pode se multiplicar sem causar sintomas ou lesões. Desse modo, a transmissão dessa bactéria para as fêmeas se dá através do coito, decorrente da monta natural, ou através da inseminação artificial envolvendo sêmen contaminado (BONDURANT, 2005; MSHELIA et al., 2010). Uma vez na fêmea, o *C. fetus* subsp. *venerealis* pode se instalar causando uma doença chamada campilobacteriose venérea bovina (CVB), caracterizada por aborto e infertilidade temporária (GIVENS, 2006).

A ocorrência de doenças venéreas em bovinos nos países desenvolvidos tem decrescido nos últimos anos, principalmente devido ao grande controle sobre a inseminação artificial e vacinação. No entanto, inúmeros casos ainda são relatados de CVB em locais onde se utiliza a monta natural como estratégia de reprodução (BONDURANT, 2005; VARGAS et al., 2002). Em um estudo recente, Alves et al. (2011) relata que aproximadamente metade dos rebanhos brasileiros são contaminados pela bactéria, sendo 20% dos animais de corte infectados, em propriedades contaminadas.

Um dos maiores fatores de patogenicidade dessa bactéria se trata de uma proteína de superfície, chamada de SAP (*Surface Array Protein*) tipo A (GROGONOTHOMAS et al., 2000). Existem 9 variantes dessa proteína (Fig. 17), que são

controladas pelo mesmo promotor e possuem massa aparente entre 97-149kDa (BLASER et al., 1994). O locus que contém os genes dessas variantes, chamados de *sapA*, é altamente versátil, fazendo com que a bactéria produza essa proteína em níveis praticamente aleatórios. No caso, diferentes isolados podem apresentar padrão de expressão diferente quando expostos às mesmas condições de cultivo. Ainda, esse locus pode “mesclar” regiões de diferentes variantes de modo a criar uma nova, regulada pelo mesmo promotor (TU et al., 2003).

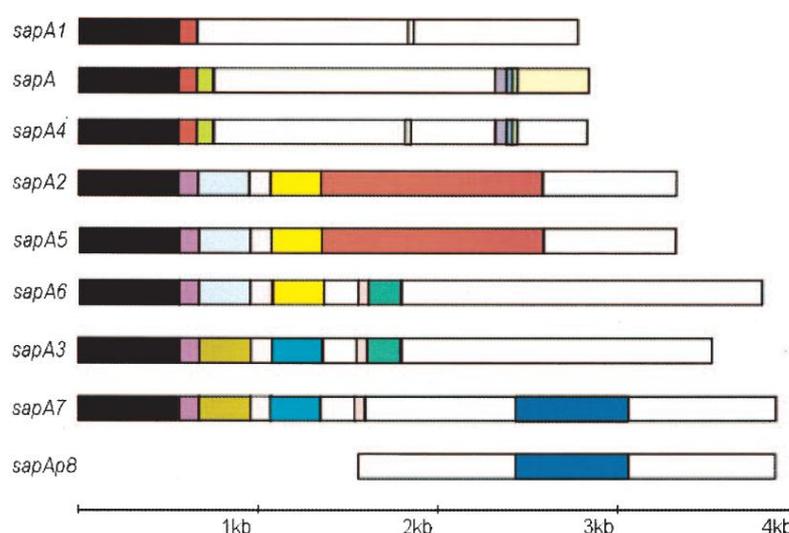


Figura 17 – Representação dos genes que codificam as 9 variantes da proteína SapA (adaptado de TU et al., 2003). As regiões coloridas com a mesma cor indicam sequências com alta identidade.

Essa variabilidade genômica desse importante fator de virulência torna difícil o desenvolvimento de uma vacina eficaz. De fato, até hoje o desenvolvimento de vacinas contra esse patógeno é bastante incipiente, se limitando à identificação de novos alvos proteicos para estudo (ALI et al., 2012). Ainda, não existem relatos sobre o desenvolvimento de vacinas recombinantes para esse patógeno, bem como não há relato de novas estratégias para solucionar problemas quanto à detecção dessa bactéria. Assim, o presente projeto busca aplicar uma nova estratégia para o desenvolvimento de uma vacina ou teste diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis*

utilizando uma versão recombinante da proteína SapA como alvo de estudo. Desse modo, os problemas quanto à vacinação e à identificação prévia de um animal infectado ou amostra de sêmen contaminada poderiam ser contornados.

4.1.2. Objetivos

4.1.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma vacina e/ou teste diagnóstico para CVB baseado em uma nova proteína recombinante expressa em *Escherichia coli*.

4.1.2.2. Objetivos Específicos

- Desenhar um gene contendo regiões conservadas das nove variantes de *sapA*;
- Clonar o novo gene de SapA, bem como suas subunidades individuais, em vetor de expressão para *Escherichia coli*;
- Caracterizar a expressão de 3 novas proteínas recombinantes contendo as regiões conservadas de SapA.

4.1.3. Materiais e Métodos

4.1.3.1. Desenho do gene sintético *sapAn78*

Um gene foi desenhado tendo como base as sequências das proteínas SapA de *C. fetus*, depositadas no banco de dados GenBank (código de acesso: 28974206). Essas sequências foram alinhadas pela ferramenta *Clustal Omega*

(EBI). Com o alinhamento, foram identificadas duas regiões interessantes para a construção do gene sintético: uma da porção N-terminal, comum a 8 das 9 variantes; e outra comum às variantes SapA7 e SapA8. Entre essas duas regiões, foi adicionado uma sequência flexível de 15 aminoácidos, sendo 3 repetições de Gly₄-Ser, abreviada como (Gly₄-Ser)₃. A Fig. 18 ilustra de modo simplificado a construção do gene e seus possíveis produtos proteicos.

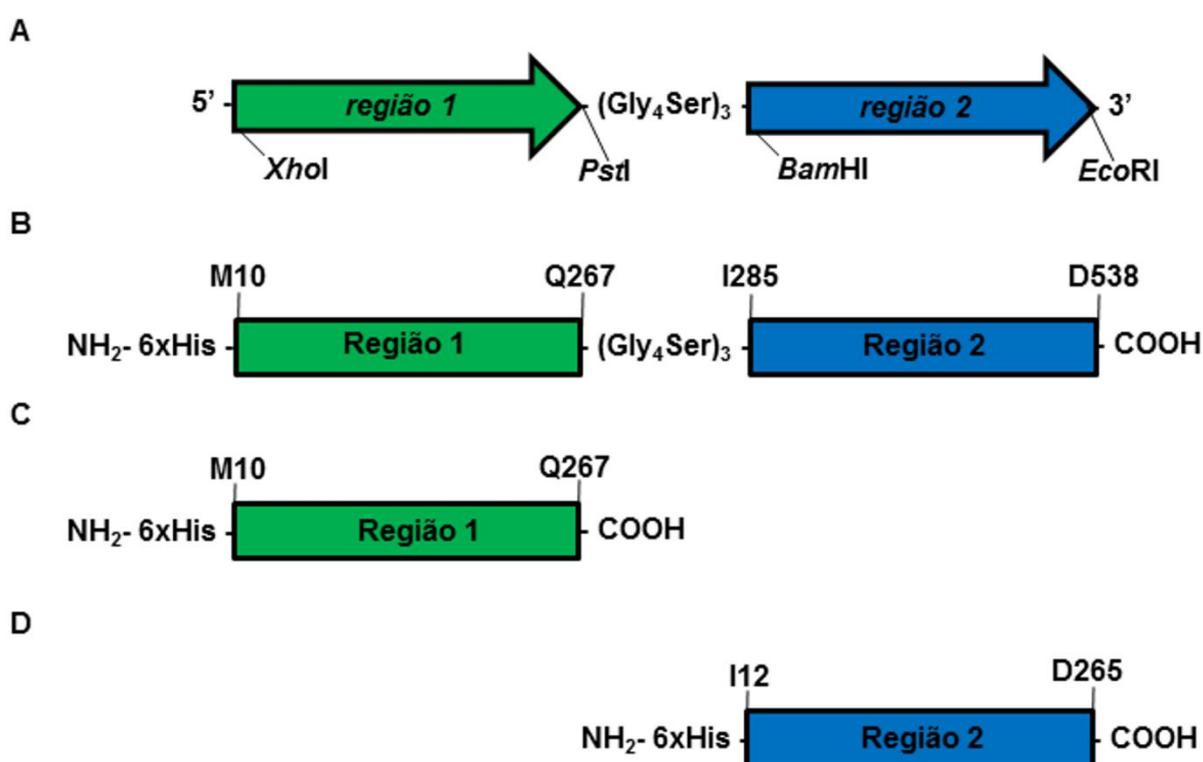


Figura 18 – Representação do gene desenhado e de seus possíveis produtos proteicos. **(A)** Esquema do gene sintético desenhado, mostrando seus sítios de restrição para as enzimas *XhoI*, *PstI*, *BamHI* e *EcoRI*, que permitem clonar as duas regiões em tandem ou individualmente. **(B)** Esquema da proteína com ambas as regiões. Entre elas, a sequência flexível (Gly₄Ser)₃ facilita o dobramento individual das duas subunidades. **(C)** Representação do produto proteico da Região 1, comum a 8 das 9 variantes de SapA. **(D)** Representação do produto proteico da Região 2, comum às variantes de SapA7 e SapA8.

4.1.3.2. Clonagem e expressão dos genes *sapAn78*, *sapAn* e *sapA78*

A sequência codificadora do gene construído foi encomendada da empresa Epoch Life Science (Missouri City, Texas, EUA) contendo códons preferenciais para expressão em *E. coli*, bem como os sítios de restrição *XhoI* e *EcoRI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente, e *PstI* e *BamHI* na região central. O gene encomendado foi clonado em um plasmídeo, sendo chamado de pUC18-*sapAn78*. Esse plasmídeo foi propagado e extraído conforme já descrito (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O gene *sapAn78* foi subclonado para o vetor de expressão pAE após a clivagem com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* e ligação com T4 DNA ligase, formando o plasmídeo pAE-*sapAn78*. A partir dele, cada uma das duas regiões da construção foram subclonadas separadamente em pAE. Para o gene *sapAn*, foram utilizadas as enzimas *XhoI* e *PstI*, enquanto para o *sapA78*, foram utilizadas *BamHI* e *EcoRI*. Após a transformação e triagem dos clones recombinantes, a expressão foi feita em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS em 10mL de caldo LB induzido com IPTG para uma concentração final de 0,5mM por 3h a 37°C e 150rpm. A avaliação da expressão foi feita por SDS-PAGE 12% dos extratos bacterianos.

4.1.4. Resultados

4.1.4.1. Clonagem e expressão do gene *sapAn78*

O plasmídeo pUC18-*sapAn78* encomendado foi extraído (Fig. 18A) e, em seguida, digerido com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, apresentando uma banda correspondente ao do gene desenhado (1.600 pb) (Fig. 18B).

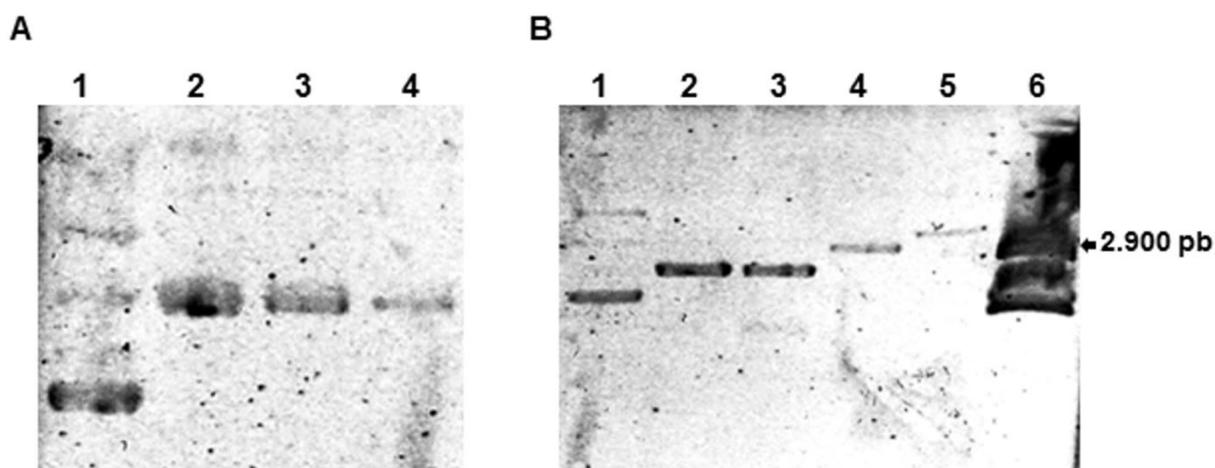


Figura 19 – Gel de agarose 0,8% das extrações de pUC18-*sapAn78* e das digestões para a subclonagem. **(A)** Extração do plasmídeo pUC18-*sapAn78*. 1- pAE circular; 2- pUC18-*sapAn78* eluição 1; 3- pUC18-*sapAn78* eluição 2; 4- pUC18-*sapAn78* eluição 3. **(B)** Eletroforese das digestões de pAE e pUC18-*sapAn78*. 1- pAE circular; 2 e 3- pAE linear; 4 e 5- pUC18-*sapA* linear; 6- pUC18-*sapA/XhoI* e *EcoRI*.

Após purificar o gene *tacs* do gel e o vetor pAE da reação, ambos foram quantificados, ligados por T4 DNA ligase, usados para transformar *E. coli* TOP10 e triados quanto à presença de clones recombinantes contendo pAE-*sapAn78*. Então, os clones 2, 3, 10, 11 e 17 foram identificados como possíveis recombinantes (Fig. 19).

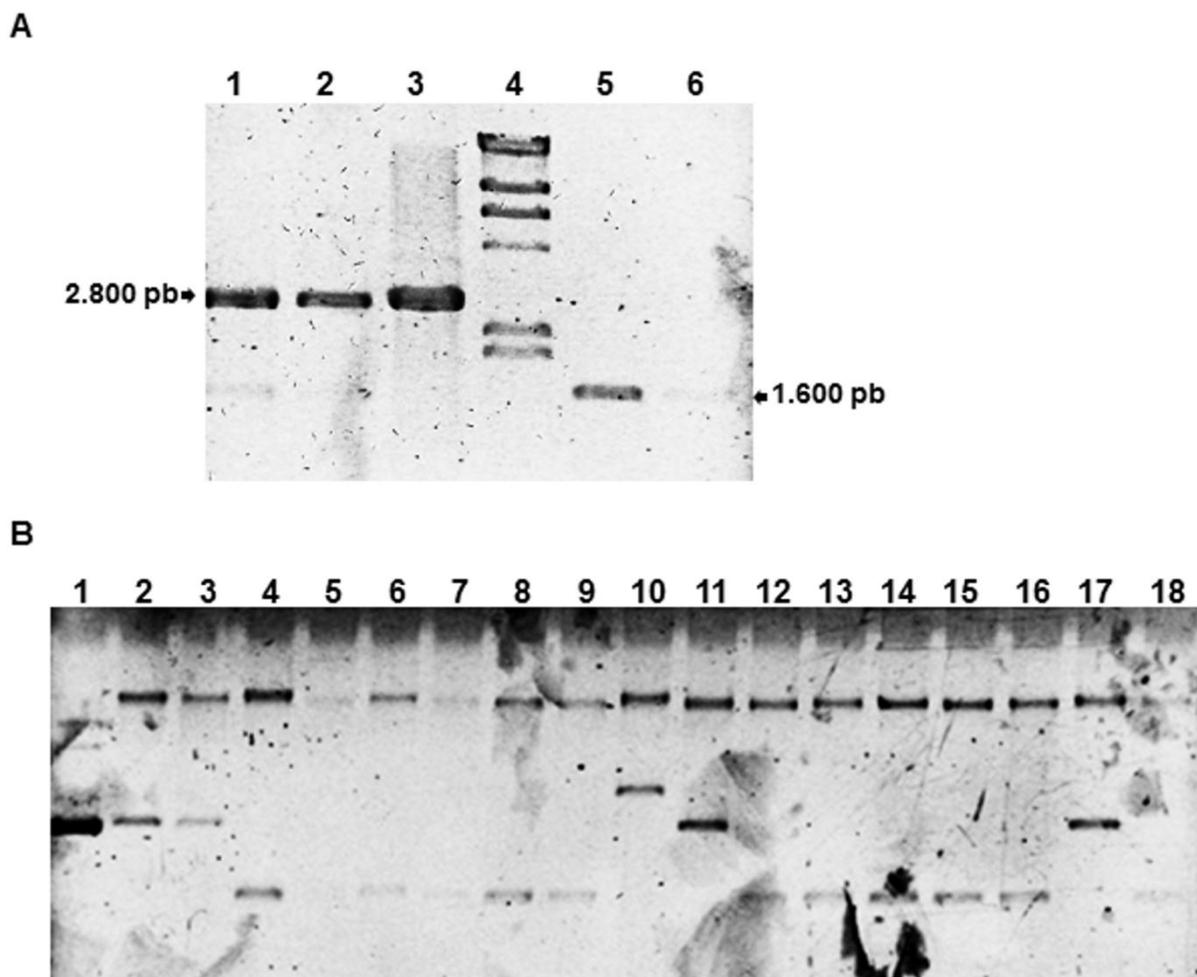


Figura 20 – Gel de agarose 0,8% para quantificação do vetor pAE e do gene *sapAn78* com λ DNA/*Hind*III (Invitrogen) e triagem de clones recombinantes. **(A)** Eletroforese do vetor pAE e gene *sapAn78* purificados. 1- pAE/*Xho*I e *Eco*RI eluição 1; 2- pAE/*Xho*I e *Eco*RI eluição 2; 3- pAE circular; 4- λ DNA/*Hind*III 250 ng (Invitrogen); 5- *sapAn78*/*Xho*I e *Eco*RI eluição 1; 6- *sapAn78*/*Xho*I e *Eco*RI eluição 2. **(B)** Triagem das colônias transformantes da ligação de pAE-*sapAn78*. 1- pAE circular; 2- 18- colônias 1-17. As colônias dos poços 2, 3, 10, 11 e 17 foram escolhidas e propagadas.

Os cinco clones identificados como recombinantes foram propagados e três deles conferidos por digestão enzimática com *Xho*I e *Eco*RI quanto à presença do inserto (Fig. 20). Desse modo, identificou-se que todos os três clones avaliados eram recombinantes, uma vez que apresentaram a liberação de fragmentos na altura esperada (1.600pb).

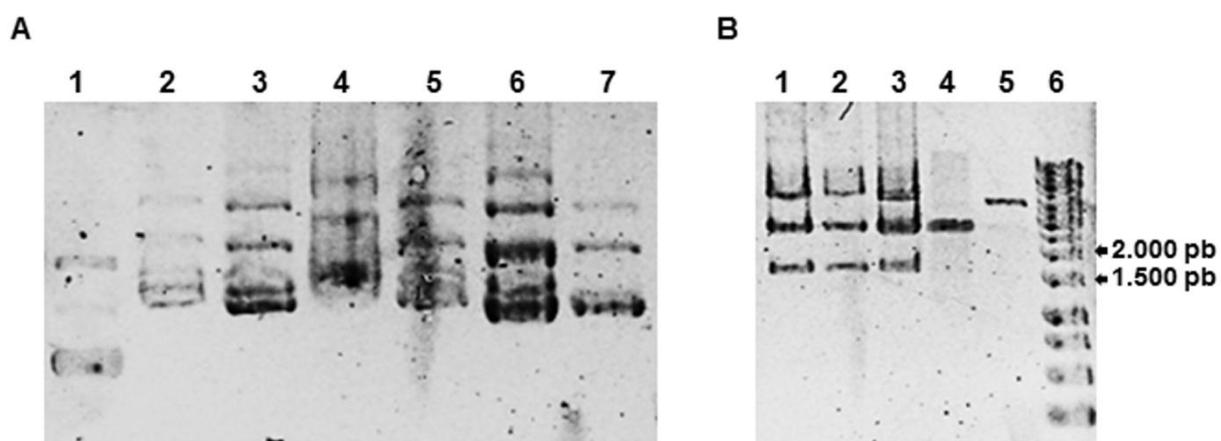


Figura 21 – Verificação da extração e digestão para a confirmação da presença de inserto em pAE-*sapAn78*. 1- pAE circular; 2-6- clones 2, 3, 10, 11 e 17; 7- pUC18-*sapAn78* circular. **(B)** Digestão para a confirmação do inserto de pAE-*sapAn78*. 1-3- clone 2, 3 e 17, respectivamente, digeridos com *Xho*I e *Eco*RI; 4- pAE linear; 5- pUC18-*sapAn78* linear; 6- marcador 1 kb (Thermo Scientific).

Um desses clones foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e avaliado quanto a expressão por SDS-PAGE 12%. Foi verificada uma banda com massa de 60kDa correspondente a esperada nos três clones induzidos com IPTG (Fig. 21).

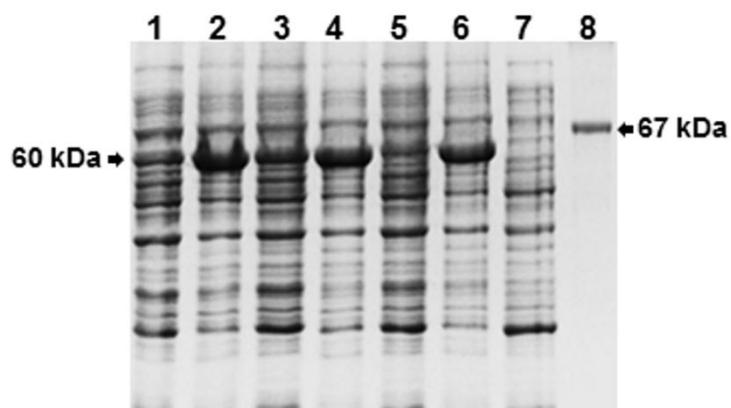


Figura 22 – SDS-PAGE 12% do teste de expressão de rSapAn78 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. 1- clone 2 não induzido; 2- clone 2 induzido; 3- clone 3 não induzido; 4- clone 3 induzido; 5- clone 17 não induzido; 6- clone 17 induzido; 7- extrato de *E. coli* pLysS (C-); 8- BSA 1,5µg (67kDa).

4.1.4.2. Clonagem dos genes *sapAn* e *sapA78*

O vetor pAE-*sapAn78* construído foi utilizado para clonar as duas regiões de *sapA* separadamente em pAE. Esse plasmídeo foi digerido com *XhoI* e *PstI*, para clonagem de *sapAn*, e *BamHI* e *EcoRI*, para clonagem de *sapA78*. Assim, foi possível observar a liberação de fragmentos de 800 pb, correspondentes a ambos os genes (Fig. 22A). Esses fragmentos foram purificados e quantificados, bem como o vetor pAE (Fig. 22B). Logo, foi feita a ligação com T4 DNA ligase, transformação de *E. coli* TOP10 e triagem dos clones recombinantes (Fig. 22C). Os clones 3, 5 e 6, referentes ao vetor pAE-*sapAn*, e o 2 e 7, referentes ao vetor pAE-*sapA78* foram identificados como possíveis recombinantes.

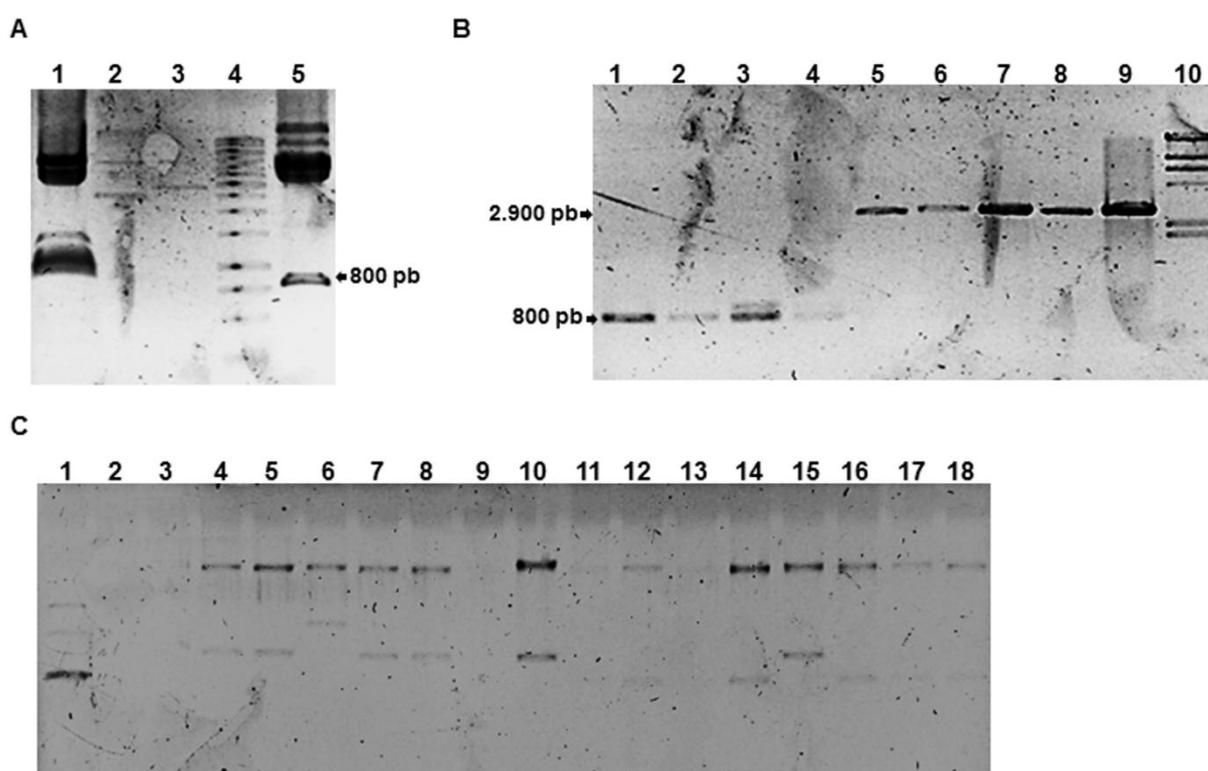


Figura 23 – Géis de agarose 0,8% das etapas de obtenção dos plasmídeos pAE-*sapAn* e pAE-*sapA78*. 1- pAE-*sapAn78/XhoI* e *PstI*; 2- pAE circular; 3- pAE linear; 4- marcador 1kb (Thermo Scientific); 5- pAE-*sapAn78/BamHI* e *EcoRI*. (B) Quantificação do vetor pAE e dos genes *sapAn* e *sapA78* por λ DNA/*HindIII* (Invitrogen). 1 e 2- *sapA78/BamHI* e *EcoRI* eluições 1 e 2; 3 e 4-

sapAn/XhoI e *PstI* eluições 1 e 2; **5 e 6**- pAE/*XhoI* e *PstI* eluições 1 e 2; **7 e 8**- pAE/*BamHI* e *EcoRI* eluições 1 e 2; **9**- pAE linear; **10**- λ DNA/*HindIII* 250ng. **(C)** Eletroforese das extrações de plasmídeo das colônias triadas. 1- pAE circular; **2-8**- clones 1-7 pAE-*sapAn*; **9-18**- clones 1-10 pAE-*sapA78*.

Os 5 clones supostamente recombinantes foram propagados, mas apenas 4 tiveram seus plasmídeos extraídos e corridos em gel de agarose 0,8% (Fig. 23A). Assim foram identificados dois clones recombinantes de pAE-*sapAn* e um de pAE-*sapA78*, os quais tiveram a presença de inserto confirmada através de digestão com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem (Fig. 23B).

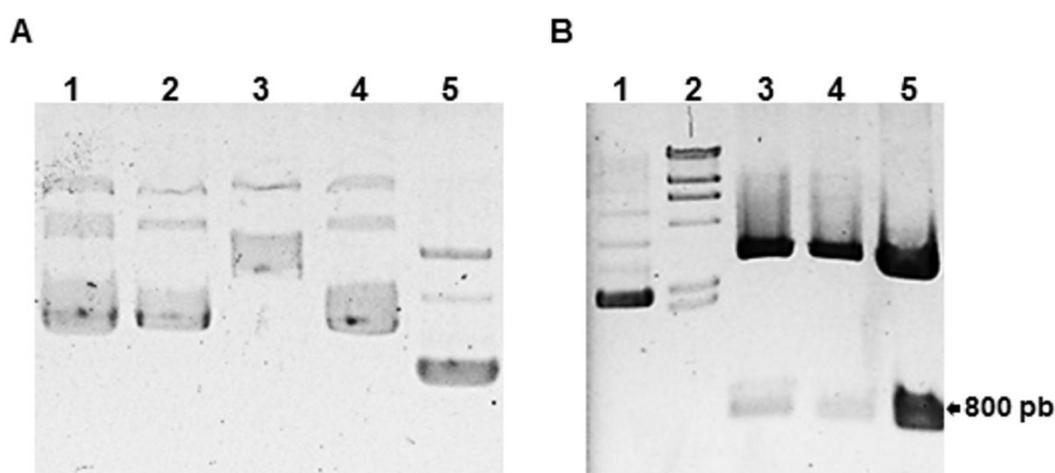


Figura 24 – Gel de agarose 0,8% da purificação e digestão dos plasmídeos pAE-*sapAn* e pAE-*sapA78* para a confirmação de inserto. **(A)** Extração plasmideal dos clones de pAE-*sapAn* e pAE-*sapA78*. 1- pAE-*sapAn* clone 5; 2- pAE-*sapAn* clone 6; 3- pAE-*sapA78* clone 2; 4- pAE-*sapA78* clone 7; 5- pAE circular. **(B)** Digestão dos plasmídeos extraídos para a confirmação do inserto. 1- pAE circular; 2- λ DNA/*HindIII* 250 ng; 3- pAE-*sapAn/XhoI* e *PstI* clone 5; 4- pAE-*sapAn/XhoI* e *PstI* clone 6; 5- pAE-*sapA78/BamHI* e *EcoRI* clone 7.

4.1.5. Conclusões e perspectivas

A proteína quimérica rSapAn78 foi expressa em *E. coli*. Essa proteína será produzida em maior quantidade de modo a testar sua aplicabilidade como antígeno

vacinal ou componente diagnóstico. Além disso, as duas subunidades dessa quimera foram clonadas separadamente no vetor pAE de expressão em *E. coli*. Essas construções serão posteriormente expressas em *E. coli* e, assim como rSapAn78, serão testadas no desenvolvimento de vacinas ou diagnósticos.

5. Referências

ALI, A.; SOARES, S.C.; SANTOS, A.R.; GUIMARÃES, L.C.; BARBOSA, E.; ALMEIDA, S.S.; ABREU, V.A.C.; CARNEIRO, A.R.; RAMOS, R.T.J.; BAKHTIAR, S.M. et al. *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. **Gene**, v. 508, n. 2, p. 145–156, 2012.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 16–23, 2010.

ALVES, T.M.; STYNEN, A.P.R.; MIRANDA, K.L.; LAGE, A.P. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 336–344, 2011.

AMIMOTO, K.; OHGITANI, T.; SASAKI, O.; OISHI, E.; KATAYAMA, S.; ISOGAI, M.; OTA, S. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccine against challenge with spores in guinea pigs. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 64, n. 1, p. 67–69, 2002.

ASSIS, R.A. DE; MABONI, F.; PIRES, P.S.; SALVARANI, F.M.; LEOPOLDO, P. Bovine clostridial myonecrosis. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 331–334, 2010.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E.; NASCIMENTO, R.A.P.; VERA, L. V.; UZAL, F.A. An outbreak of malignant edema in cattle. **Revista Portuguesa De Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p. 143–145, 2002.

BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D.; TWETEN, R.K. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 784–790, 1992.

BALLARD, J.; CRABTREE, J.; ROE, B. A.; TWETEN, R.K. The primary structure of *Clostridium septicum* alpha-toxin exhibits similarity with that of *Aeromonas hydrophila* aerolysin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 1, p. 340–344, 1995.

BALLARD, J.; SOKOLOV, Y.; YUAN, W.L.; KAGAN, B.L.; TWETEN, R.K. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 627–634, 1993.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v. 76, n. 4, p. 591–596, 2007.

BESSE, N.G.; BARRE, L.; BUHARIWALLA, C.; VIGNAUD, M.L.; KHAMISSI, E.; DECOURSEULLES, E.; NIRSIMLOO, M.; CHELLY, M.; KALMOKOFF, M. The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 345–351, 2010.

BLASER, M.J.; WANG, E.; TUMMURU, M.K.; WASHBURN, R.; FUJIMOTO, S.; LABIGNE, A. High-frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by *sapA* mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 453–462, 1994.

BONDURANT, R.H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 383–408, 2005.

BUENO, V.F.; BANERJEE, P.; BANADA, P.P.; JOSÉ DE MESQUITA, A.; LEMES-MARQUES, E.G.; BHUNIA, A.K. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and *in vitro* cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 20, n. 1, p. 43–59, 2010.

BURNS, R. **Immunochemical Protocols** (Methods in Molecular Biology). 3^a Ed. Totowa: Humana Press, 2004. 328p.

CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms Cantaloupe - United States, August-September 2011. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 46, p. 1357–1358, 2011.

CHEW, S.S.; LUBOWSKI, D.Z. *Clostridium septicum* and malignancy. **ANZ Journal of Surgery**, v. 71, n. 11, p. 647–649, 2001.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N. AND DELLAGOSTIN, O.A. 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**, v. 24, n. 29-30, p. 5734–5743, 2006.

DRAMSI, S.; KOCKS, C.; FORESTIER, C.; COSSART, P. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 931–941, 1993.

ECONOMEDES, D.M.; SANTORO, J.; DEIRMENGIAN, C.A. *Clostridium septicum* growth from a total knee arthroplasty associated with intestinal malignancy: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 235, 2012.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S. DE O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250–1256, 2007.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 851–875, 2005.

GIVENS, M.D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 648–654, 2006.

GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F.; BERCHE, P.; BLOECKER, H.; BRANDT, P.; CHAKRABORTY, T. et al. Comparative Genomics of *Listeria* Species. **Science**, v. 849, n. 2001, p. 849–852, 2001.

GNERLICH, J.L.; RITTER, J.H.; KIRBY, J.P.; MAZUSKI, J.E. Simultaneous necrotizing soft tissue infection and colonic necrosis caused by *Clostridium septicum*. **Surgical Infections**, v. 12, n. 6, p. 501–506, 2011.

GORDON, V.M.; BENZ, R.; FUJII, K.; LEPPLA, S.H.; TWETEN, R.K. *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4130–4134, 1997.

GORDON, V.M.; NELSON, K.L.; BUCKLEY, J.T.; STEVENS, V.L.; TWETEN, R.K.; ELWOOD, P.C.; LEPPLA, S.H. *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored protein receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 27274–27280, 1999.

GROGONO-THOMAS, R.; DWORKIN, J.; BLASER, M.J.; NEWELL, D.G. Roles of the surface layer proteins of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in ovine abortion. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1687–1691, 2000.

GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A.; MECHAÏ, F.; MAMZER-BRUNEEL, M.F.; BIELECKA, M.K.; SCORTTI, M.; DISSON, O.; BERCHE, P. et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 136–138, 2010.

HAAS, J.; KUSINSKI, K.; PORE, S.; SHADMAN, S.; VAHEDI, M. A. Ride with *Listeria monocytogenes*: A Trojan Horse. **Eukaryon**, v. 3, n. February, p. 47–54, 2007.

HAIN, T.; CHATTERJEE, S.S.; GHAI, R.; KUENNE, C.T.; BILLION, A.; STEINWEG, C.; DOMANN, E.; KÄRST, U.; JÄNSCH, L.; WEHLAND, J. et. al. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 297, n. 7-8, p. 541–557, 2007.

HANG'OMBE, M.B.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S. Relationship between *Clostridium septicum* alpha-toxin activity and binding to erythrocyte membranes. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, n. 1, p. 69–74, 2005.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a Laboratory Manual. 1st Ed. New York: Cold Spring Harbor, 1998. 726p.

HATHEWAY, C.L. Toxigenic Clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66–98, 1990.

HEO, S.A.; NANNAPANENI, R.; STORY, R.P.; JOHNSON, M.G. Characterization of new hybridoma clones producing monoclonal antibodies reactive against both live and heat-killed *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. M008–15, 2007.

JANZTEN, M.M.; NAVAS, J.; CORUJO, A.; MORENO, R.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ-SUAREZ, V.J. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 235–247, 2006.

JOHNSON, S. Antibody responses to clostridial infection in humans. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 25 Suppl 2, p. S173–7, 1997.

KENNEDY, C.L.; KREJANY, E.O.; YOUNG, L.F.; O'CONNOR, J.R.; AWAD, M.M.; BOYD, R.L.; EMMINS, J.J.; LYRAS, D.; ROOD, J.I. The alpha-toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1357–1366, 2005.

KOO, O.K.; AROONNUAL, A.; BHUNIA, A.K. Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of *Listeria monocytogenes* in the presence of other *Listeria* in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 93–104, 2011.

LAER, A.; LIMA, A. DE; TRINDADE, P.; ANDRIGUETTO, C.; DESTRO, M.; SILVA, W. DA. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574–582, 2009.

LARSON, C.M.; BUBRICK, M.P.; JACOBS, D.M.; WEST, M.A. Malignancy, mortality, and medicosurgical management of *Clostridium septicum* infection. **Surgery**, v. 118, n. 4, p. 592–8, 1995.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.D.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M. et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. Pt 9, p. 2210–2214, 2010.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1216–1225, 2007.

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**, v. 51, n. 4, p. 445–455, 2007.

LIMA, C.; SALVARANI, F.M.; GOMES, A.D.M.; SILVA, D. DA; ASSIS, R.A.; COSTA, J.N.; LOBATO, F. Outbreak of gas gangrene in a flock of sheeps and goats. **Ciência Veterinária Nos Trópicos**, v. 9, n. 2/3, p. 106–109, 2006.

LIN, M.; ARMSTRONG, S.; RONHOLM, J.; DAN, H.; AUCLAIR, M.-E.; ZHANG, Z.; CAO, X. Screening and characterization of monoclonal antibodies to the surface antigens of *Listeria monocytogenes* serotype 4b. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1705–1714, 2009.

LOBATO, F.C.F.; DIAS, L.D.; SALVARANI, F.M.; MARTINS, N.É.; NASCIMENTO, R.A.P. DO; ASSIS, R.A. de. Evaluation of potency of vaccines against *Clostridium septicum* commercialized in Brazil. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 225–228, 2008.

MANSOUR, A.A.; MOUSAVI, S.L.; RASOOLI, I.; NAZARIAN, S.; AMANI, J.; FARHADI, N. 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**, v. 38, n. 2, p. 260–264, 2010.

MELDRUM, R.J.; ELLIS, P.W.; MANNION, P.T.; HALSTEAD, D.; GARSIDE, J. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods sampled from the point

of sale in Wales, United Kingdom. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 8, p. 1515–1518, 2010.

MENDONÇA, M.; CONRAD, N.L.; CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DA SILVA, W.P.; ALEIXO, J.A.; BHUNIA, A.K. Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 275, 2012.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MEGE R-M; COSSART, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 923–932, 1996.

MICHELON, A.; CONCEIÇÃO, F.R.; BINSFELD, P.C.; DA CUNHA, C.W.; MOREIRA, A.N.; ARGONDIZZO, A.P.; MCINTOSH, D.; ARMÔA, G.R.G.; CAMPOS, A.S.; FARBER, M. et al. Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. **Vaccine**, v. 24, n. 37-39, p. 6332–6339, 2006.

MILACH, A.; DE LOS SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G.; MOREIRA, A.N.; DE 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.

MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; FATTORINI, F.R.; TERZOLO, H. Malignant oedema associated with blood-sampling in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 5, p. 280–281, 2002.

MSHELIA, G.D.; AMIN, J.D.; WOLDEHIWET, Z.; MURRAY, R.D.; EGWU, G.O. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 5, p. e221–30, 2010.

NIGHTINGALE, K.K.; WINDHAM, K.; MARTIN, K.E.; YEUNG, M.; WIEDMANN, M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial ce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8764–8772, 2005.

OLSEN, S.J.; PATRICK, M.; HUNTER, S.B.; REDDY, V.; KORNSTEIN, L.; MACKENZIE, W.R.; LANE, K.; BIDOL, S.; STOLTMAN, G.A.; FRYE, D.M. et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 7, p. 962–967, 2005.

ORAVCOVÁ, K.; TRNCÍKOVÁ, T.; KUČHTA, T.; KAČLÍKOVÁ, E. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 429–437, 2008.

ORSI, R.H.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 301, n. 2, p. 79–96, 2011.

O'CONNOR, L.; O'LEARY, M.; LEONARD, N.; GODINHO, M.; O'REILLY, C.; COFFEY, L.; EGAN, J.; O'MAHONY, R. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 490–498, 2010.

PENTECOST, M.; KUMARAN, J.; GHOSH, P.; AMIEVA, M.R. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. e1000900, 2010.

PIZARRO-CERDÁ, J.; PAYRASTRE, B.; WANG, Y.-J.; VEIGA, E.; YIN, H.L.; COSSART, P. Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria*

monocytogenes entry into target cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2381–2390, 2007.

PLITAS, G.; CHAUDHRY, U.I.; KINGHAM, T.P.; RAAB, J.R.; DEMATTEO, R.P. NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4411–4416, 2007.

POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; BERCHE, P. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 142, n. Pt 1, p. 173–180, 1996.

PRON, B.; BOUMAILA, C.; JAUBERT, F.; BERCHE, P.; MILON, G.; GEISSMANN, F.; GAILLARD, J.L. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 331–340, 2001.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 158–171, 2008.

ROCHA, A. S. R.; CONCEIÇÃO, F.R.; GRASSMANN, A.A.; LAGRANHA, V.L.; DELLAGOSTIN, O.A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 677–686, 2008.

SALVARANI, F.; LOBATO, Z.; ASSIS, R.; LIMA, C.; SILVA, R.; PIRES, P.; LOBATO, F. *In vitro* evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 62, n. 4, p. 778-783, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2^a Ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 2344p.

SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H.; OGIKUBO, Y.; TAKIKAWA, N.; TAMURA, Y. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 257–267, 2002.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R. V; WIDDOWSON, M.-A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SEIXAS, F.K.; FERNANDES, C.H.; HARTWIG, D.D.; CONCEIÇÃO, F.R.; ALEIXO, J.A.G.; DELLAGOSTIN, O.A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 472–479, 2007.

SELLMAN, B.R.; KAGAN, B.L.; TWETEN, R.K. Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 551–558, 1997.

SELLMAN, B.R.; TWETEN, R.K. The propeptide of *Clostridium septicum* alpha toxin functions as an intramolecular chaperone and is a potent inhibitor of alpha toxin-dependent cytolysis. **Molecular Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 429–440, 1997.

SIMPSON BEAUCHAMP, C.; BYELASHOV, O.A.; GEORNARAS, I.; KENDALL, P.A.; SCANGA, J.A.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 144–149, 2010.

SMITH, L.A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v. 27, n. 4, p. D33–9, 2009.

STEVENS, D.L.; TWETEN, R.K.; AWAD, M.M.; ROOD, J.I.; BRYANT, A. E. Clostridial gas gangrene: evidence that alpha and theta toxins differentially modulate

the immune response and induce acute tissue necrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 189–195, 1997.

TROST, M.; WEHMHÖNER, D.; KÄRST, U.; DIETERICH, G.; WEHLAND, J.; JÄNSCH, L. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 1544–1557, 2005.

TU, Z.-C.; WASSENAAR, T.M.; THOMPSON, S. A; BLASER, M.J. Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* *sap* locus. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 685–698, 2003.

VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; VAINSTEIN, M.H.; KREUTZ, L.C.; NEVES, J.P. *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* surface array protein from bovine isolates in Brazil. **Current Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 111–114, 2002.

VASCONCELLOS, F.A.; ALEIXO, P.B.; STONE, S.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. Generation and characterization of new HER2 monoclonal antibodies. **Acta Histochemica**, 2012.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

WERBROUCK, H.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN PAMEL, E.; RIJPENS, N.; VAN DAMME, J.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E. Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3862–3871, 2006.

WHO/FAO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Technical Report**, 2004.

WICHROSKI, M.J.; MELTON, J.A.; DONAHUE, C.G.; TWETEN, R.K.; WARD, G.E. *Clostridium septicum* alpha-toxin is active against the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* and targets members of the SAG family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface proteins. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4353–4361, 2002.

ZHANG, Y.; BIAN, Y.-Q.; ZHAO, B.-H. The study on the cloning and expression of alpha toxin gene of *Clostridium septicum* and the immunity of the toxoid. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 67–72, 2007.

ZITZ, U.; ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K.J.; WILRICH, P.-T.; KNEIFEL, W. Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 8, p. 1282–1287, 2011.