

TESTE DE UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA GANGRENA GASOSA CAUSADA POR *Clostridium septicum*

GUSTAVO MARÇAL SCHMIDT GARCIA MOREIRA¹; CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA¹; FELIPE MASIERO SALVARANI²; CLÓVIS MOREIRA JÚNIOR¹; MARCELO MENDONÇA¹; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

E-mails: moreira.gmsg@gmail.com (autor); fabricio.rochedo@ufpel.edu.br (orientador)

1. INTRODUÇÃO

A infecção pela bactéria *Clostridium septicum* pode causar gangrena gasosa em animais. Essa doença é de difícil tratamento e diagnóstico, uma vez que a maioria dos animais infectados é diagnosticada após a morte ou em estágio terminal. Na saúde humana, uma das alternativas para tratar pessoas infectadas é através da amputação de membros ou remoção do local infectado (GNERLICH et al., 2011). Além da cirurgia, também é feita a administração de antibióticos e sessões de terapia com oxigênio hiperbárico, porém com pouca efetividade. Em animais, a infecção é decorrente da falta de higiene em feridas ou em práticas que envolvam a manipulação do animal, como a castração, vacinação inadequada, parto, entre outras (MORRIS et al., 2002). Contudo, não é descrito tratamento veterinário economicamente viável, inviabilizando a remediação dos animais.

A bactéria produz uma toxina hemolítica – toxina alpha (TACS) – capaz de causar quadros que caracterizam a gangrena gasosa. Assim, considerando a falta de tratamento efetivo, a melhor alternativa para o controle dessa doença é através da vacinação que induza a produção de anticorpos neutralizantes contra TACS (AMIMOTO et al., 2002). No Brasil, diversos surtos de gangrena gasosa causada por *C. septicum* indicam falhas nas vacinas comerciais brasileiras (LIMA et al., 2006). De fato, essas vacinas não atingem os pré-requisitos determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (LOBATO et al., 2008). Ainda, o processo para a produção de vacinas contra o gênero *Clostridium* se mostra complicado, uma vez que as bactérias devem ser cultivadas em condições anaeróbicas com diversos suplementos e resultam em baixo rendimento. Outro fator negativo é que as bactérias e toxinas produzidas podem causar doenças em humanos, representando grande risco para os operadores.

Levando em consideração o panorama descrito sobre vacinas contra *C. septicum* no Brasil, o presente trabalho demonstra o desenvolvimento e teste de uma vacina composta pela TACS recombinante (rTACS) produzida em *Escherichia coli*, a qual foi submetida ao teste de qualidade exigido pelo MAPA visando solucionar parte dos problemas de produção e efetividade das vacinas nacionais contra essa doença.

2. METODOLOGIA

Clonagem, expressão e caracterização de rTACS

Os procedimentos dessa etapa foram descritos detalhadamente por MOREIRA (2013). Brevemente, o vetor de expressão pAE-*tacs* foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) cepa pLysS por choque-térmico. As

células foram cultivadas em meio Luria-Bertani contendo cloranfenicol e ampicilina, sendo a expressão induzida com isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para concentração final de 0,5 mM. As células ficaram por mais 4h em agitador 150 rpm a 37 °C, foram coletadas por centrifugação, suspensas em tampão de lise (NaH₂PO₄ 0,2 M; NaCl 0,5 M; Imidazole 10 mM) com 10 μ g/mL de lisozima por 2h a 4 °C e rompidas por sonicação. A proteína, em corpos de inclusão, foi recuperada em tampão de lise contendo ureia 8 M, caracterizada por SDS-PAGE e *Western blot* e purificada por cromatografia de afinidade com Ni⁺². As frações purificadas foram dialisadas em PBS e liofilizadas, permanecendo a 4 °C até o momento do uso.

Vacinação de coelhos e teste de soroneutralização

Coelhos Nova Zelândia de aproximadamente 1,5 Kg foram divididos em 3 grupos, cada um com 8 coelhos: o grupo 1 (G1, rTACS) foi inoculado com 200 μ g de rTACS com Al(OH)₃ como adjuvante; o grupo 2 (G2, vacina comercial) foi inoculado com uma vacina comercial; e o grupo 3 (G3, controle negativo) foi inoculado com solução salina estéril. Os animais foram inoculados via subcutânea nos dias zero e 21, tendo seu sangue total extraído no dia 35. O soro do sangue de todos os animais foi obtido e um *pool* de soros foi feito para cada grupo.

O teste de soroneutralização foi feito com o *pool* de soros dos coelhos de acordo com a diretiva nº 23 do MAPA, necessário para a comercialização de vacinas para *C. septicum* no país. Nesse procedimento, uma quantidade conhecida da toxina nativa é separadamente incubada por 60 min a 37 °C com 1 mL de cada soro nas diluições 1:2 e 1:4. Em seguida, cada amostra é inoculada em dois camundongos Swiss Webster de 18-22g, os quais foram observados para morte por 72h. Os títulos das antitoxinas em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) se referem à menor diluição na qual os 2 camundongos morrem.

Verificação de imunogenicidade e antigenicidade por *Western blot* e ELISA

Para o *Western blot*, aproximadamente 5 μ g de rTACS foram transferidos para uma membrana de PVDF (GE Healthcare). O *pool* dos grupos G1 e G2 foram utilizados como anticorpos primários, sendo diluídos 1:500 em PBS-T. Como controle positivo, utilizou-se anticorpo anti-His 1:5.000 (Sigma Aldrich). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho (1:4.000) e anti-camundongo (1:4.000), ambos conjugados com peroxidase.

O ELISA foi feito em placas de 96 poços de fundo chato (Nunc), as quais foram sensibilizadas com 200 ng rTACS/poço com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,7). Diluições seriadas de base 2 do *pool* dos grupos G1 e G2 foram feitas em PBS-T a partir de 1:100 até 1:204.800. Os anticorpos secundários foram utilizados do mesmo modo como no *Western blot*. O controle negativo foi feito utilizando PBS-T em vez dos soros. A revelação foi feita com solução contendo H₂O₂ e o cromógeno o-fenilenodiamina diidroclorato (OPD), sendo a leitura feita em espectrofotômetro a 450 nm. Unidades de absorvância pelo menos 3 vezes maiores que o controle negativo foram consideradas positivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formulação contendo 200 μ g de rTACS purificada, misturada ao adjuvante Al(OH)₃ – grupo G1, não gerou níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes contra a toxina nativa, assim como o controle negativo – G3 (Tabela 1). A vacina comercial, utilizada como controle do experimento (grupo

G2), foi capaz de induzir 2 UI/mL de anticorpos neutralizantes. No entanto, esse valor é um pouco abaixo do estipulado pelo MAPA, que é de 2,5 UI/mL.

Tabela 1. Resultados da titulação do *pool* de soros dos coelhos inoculados.

Grupo	Título (UI/mL)
G1 (rTACS)	ND
G2 (vacina comercial)	2
G3 (controle negativo)	ND

ND, não detectável.

A análise por *Western blot* permitiu confirmar que a proteína rTACS é imunogênica, pois foi capaz de induzir a produção de anticorpos e, portanto, apresentou reação com o soro G1. Ainda, a reação desse soro se apresentou maior que a do soro G2 (Figura 1A). Esses resultados sugeriram que, possivelmente, os anticorpos gerados pela vacina comercial eram capazes de reconhecer epítomos conformacionais de TACS nativa que não estavam contidos em rTACS. Além disso, indicam que a vacina com rTACS foi capaz de induzir, principalmente, a produção de anticorpos contra epítomos lineares, sugerindo que a proteína recombinante não adotava dobramento semelhante à nativa.

Para avaliar essa possibilidade, um ELISA foi feito. De fato, rTACS era imunogênica, mas não antigênica, uma vez que não foi reconhecida com intensidade pelo soro G2. Sendo assim, o ELISA mostrou o mesmo padrão do *Western blot*, uma vez que o soro G1 apresentou título maior (1:3.200) em comparação ao de G2 (1:200) (Figura 1B). Tal resultado confirma que a proteína rTACS produzida não possui os epítomos conformacionais necessários para induzir resposta neutralizante efetiva contra a TACS nativa. Assim, tal formulação não poderia ser utilizada na prevenção de gangrena gasosa causada por *C. septicum*.

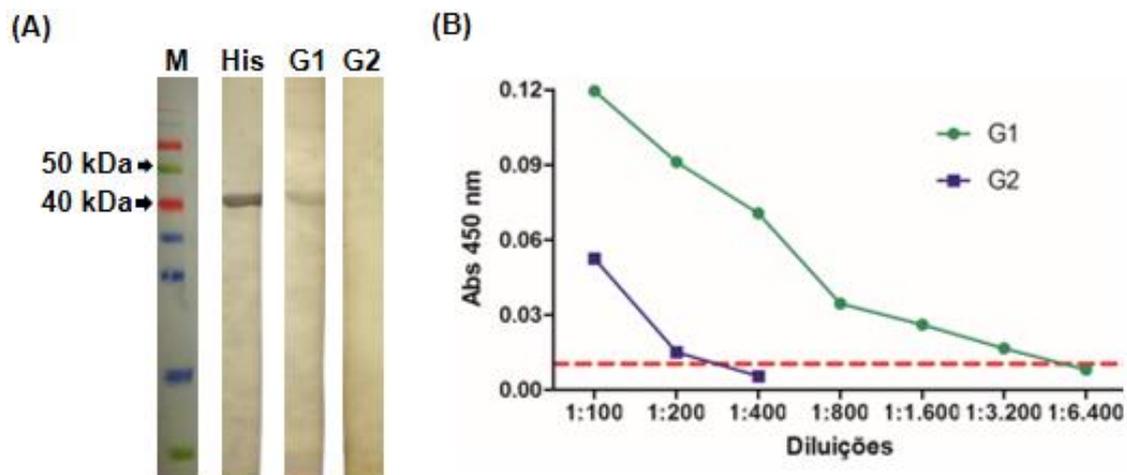


Figura 1. Avaliação de imunogenicidade e antigenicidade de rTACS por *Western blot* e ELISA. **(A)** *Western blot* frente à rTACS (≈ 42 kDa) utilizando anticorpo anti-His (His) como controle positivo. M, marcador. G1, *pool* do grupo 1. G2, *pool* do grupo 2. **(B)** Titulação por ELISA do *pool* de soros G1 e G2. Utilizando o ponto de corte do controle negativo (tracejado em vermelho), G1 apresentou titulação de 1:3.200, enquanto G2 de 1:200.

Na literatura, existem poucos relatos de utilização de TACS como antígeno vacinal. Contudo, sabe-se que TACS nativa é capaz de gerar resposta imune de modo a proteger cobaias frente a desafio com esporos de *C. septicum* (AMIMOTO

et al., 2002). Outro estudo demonstrou que rTACS é capaz de induzir proteção contra o desafio com TACS nativa em camundongos (ZHANG et al., 2007). No entanto, o presente trabalho não conseguiu reproduzir esses resultados em coelhos. Provavelmente, a proteína recombinante gerada não possuía a conformação necessária para induzir anticorpos neutralizantes, uma vez que se apresentava em corpos de inclusão solúveis apenas quando o agente desnaturante ureia era utilizado.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de vacinas efetivas contra a gangrena gasosa causada por *C. septicum* é uma necessidade atual no Brasil, visto que muitas vacinas comerciais não geram os níveis de anticorpos mínimos exigidos pelo MAPA. No entanto, a estratégia adotada nesse trabalho não demonstrou êxito quanto à efetividade da vacina. Contudo, ainda é possível traçar novas estratégias para obter um antígeno rTACS de melhor qualidade, principalmente quanto ao aumento de solubilidade para a formação de epítomos conformacionais. Desse modo, a chance gerar anticorpos neutralizantes seria aumentada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

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.

MOREIRA, G.M.S.G.. **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.

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.

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.