

# CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA TOXINA *ÉPSILON* DE *Clostridium perfringens* TIPO D E SUA APLICAÇÃO NA IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS

SOUZA, A.M.<sup>(1)</sup>; LOBATO, F.C.F.<sup>(2\*)</sup>; KALAPOTHAKIS, E.<sup>(3)</sup>; SALVARANI, F.M.<sup>(2)</sup>; LIMA, C.G.R.D.<sup>(2)</sup>; SILVA, R.O.S.<sup>(2)</sup>; PIRES, P.S.<sup>(2)</sup>; MELO, T. M.<sup>(3)</sup>; ASSIS, R.A.<sup>(4)</sup>; CARVALHO FILHO, M.B.<sup>(4)</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos anaeróbios, Gram-positivo, formador de esporos, que apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado no solo, água doce e salgada, alimentos de origem animal e vegetal, além de fazer parte da microbiota residente do trato intestinal do homem e de animais.

*Clostridium perfringens* é uma bactéria ubíqua, responsável por vários quadros clínicos como diarreias, enterotoxemia, gangrena gasosa e enterite hemorrágica em animais. A patogenicidade desse grupo está associada com as toxinas produzidas, o que está intimamente relacionado à virulência das linhagens bacterianas. A toxina *épsilon*, uma das mais potentes toxinas de origem microbiana, sendo produzida pelo *C. perfringens* tipo B ou D. Produz uma enterotoxemia fatal e grave, com uma taxa de mortalidade que pode chegar a 100% e, o surto dessa doença é de grande importância econômica em criações intensivas (Rood *et al.*, 1997).

A enterotoxemia não é transmissível, mas surtos esporádicos podem ocorrer quando o equilíbrio da microbiota intestinal é afetado, seja pelo tratamento dos animais com antibióticos, seja por mudanças bruscas na dieta.

A evolução da doença em animais jovens é quase sempre de caráter agudo ou super agudo, dificultando qualquer medida terapêutica. Todavia, o processo pode ser prevenido através da imunização com vacinas monovalentes e polivalentes (Lobato *et al.*, 2000). A imunização utilizando toxóide epsilon C e D tem sido realizada para controlar as enterotoxemia, e, para aumentar a potência desses toxóides, estratégias para obter altos títulos de toxinas que induzem altos títulos de anticorpos têm sido estudadas (Goswami *et al.*, 1996).

## 2. OBJETIVO

Produzir a toxina *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D, a partir da expressão do gene *etx* em *Escherichia coli* e testar sua aplicação na imunização de animais.

---

(1) Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC/ Betim (2) Laboratório de Bacterioses e Pesquisas – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) \*e-mail: flobato@vet.ufmg.br; (3) Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM) – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; (4) Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) - Pedro Leopoldo/MG do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Cultivo bacteriano

Foi utilizada uma linhagem de *Clostridium perfringens* tipo D caracterizada pelo Método de Gram e por testes bioquímicos.

#### 3.2. Produção, titulação e padronização da toxina *épsilon* nativa

As amostras foram testadas quanto à produção da toxina *épsilon* e a titulação foi feita em camundongos, para a determinação da DL<sub>50</sub>. A toxina produzida foi padronizada no nível de teste L+/10 contendo, no mínimo, 20 DL<sub>50</sub> em cada L+/10.

#### 3.3. Reação da cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *etx*

Para detectar a presença do gene *etx* nas amostras realizou-se a PCR descrita por Uzal *et al.* (1997).

As amostras foram consideradas como *C. perfringens* tipo D por apresentarem ampliações positivas com os iniciadores para amplificação dos genes codificantes das toxinas *alfa* e *épsilon*.

#### 3.4. PCR para amplificação do gene *etx*

Com a finalidade de amplificar o gene *etx* das amostras de *C. perfringens* tipo D foi padronizada uma PCR, sendo os iniciadores desenhados com base na seqüência do fragmento de DNA que codifica a toxina *épsilon*, depositada no *GeneBank* sob número de acesso AY858558 (Hunter *et al.*, 1992).

#### 3.5. Estratégia para clonagem e expressão do gene *etx*

O produto de PCR obtido no item anterior, após purificação, foi clonado no vetor Topo TA (kit Topo TA Cloning, Invitrogen).

Para a propagação do plasmídeo com inserto, utilizou-se a linhagem *E. coli* XL1-Blue, e, a seleção das colônias foi feita pela diferenciação entre brancas (com inserto) e azuis (sem inserto) (Sambrook e Russell, 2001).

A subclonagem foi feita utilizando o sistema pET-11a para expressão do gene *etx*.

#### 3.6. Sequenciamento para confirmação da clonagem

O sequenciamento das amostras positivas foi feito utilizando os sistemas MegaBace (Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e ABI 3130 (Applied Biosystem).

#### 3.7. Expressão do gene *etx*

O plasmídeo contendo o inserto foi utilizado para a transformação da linhagem *E. coli* BL21(DE3), e, as colônias foram selecionadas aleatoriamente para a indução da expressão utilizando IPTG (Sambrook e Russell, 2001).

A expressão foi analisada no lisado celular em gel de poliacrilamida 12% (T30% - C2,7%) contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e *Western blot* (Towbin *et al.*, 1970).

### 3.8. Estimativa da dosagem da toxina recombinante

A quantidade de proteína foi estimada em gel de poliacrilamida 12% (T30% - C2,7%) contendo SDS, comparativamente a quantidades conhecidas de soro albumina bovina (BSA): 5 µg, 10 µg e 20 µg.

### 3.9. Titulação da toxina recombinante

Camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando 17-20 g foram inoculados por via endovenosa e o título determinado em DL<sub>50</sub>/mL (Reed e Muench, 1938).

### 3.10. Produção de soro antitoxina *épsilon* recombinante

O inóculo foi preparado conforme instruções do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBISC), com modificações.

Utilizou-se coelhos machos, da raça Himalaia, pesando 2,0 kg, inoculados com 160 µg da toxina recombinante, por via subcutânea. O nível de antitoxinas foi determinado por soroneutralização (SN) em camundongos.

### 3.11. Toxinotipia e soroneutralização cruzada

Para a confirmação do tipo de toxina recombinante, foi utilizada a metodologia descrita por Batty e Glenn (1947) com modificações.

A SN cruzada foi realizada misturando 1,0 mL da toxina nativa com 1,0 mL (contendo 1,0 UI/mL) da antitoxina recombinante produzida em coelhos, e, 1,0 mL da toxina *épsilon* recombinante com 1,0 mL (contendo 1,0 UI/mL) da antitoxina nativa produzida em coelhos. Os controles positivos foram preparados misturando 1,0 mL de cada uma das toxinas, com 1,0 mL de salina peptonada 1% (p/v). Foi administrado 0,2 mL, por via endovenosa em quatro camundongos. Os animais foram observados por 72 horas.

### 3.12. Teste de potência

Foi realizado conforme recomendações da Farmacopéia Européia (European pharmacopeia, 1998), sendo inoculados três grupos com 200, 100 e 50 µg.

O valor de referência para a aprovação do *pool* de soro, não deve ser menor que cinco UI/mL, segundo recomendação da farmacopéia européia (European pharmacopeia, 1998).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cultivo bacteriano e testes bioquímicos

Os resultados das provas bioquímicas confirmam que as amostras utilizadas neste trabalho foram de *Clostridium perfringens*.

### 4.2. PCR para detecção do gene *etx*

Ocorreu amplificação dos genes para as toxinas *épsilon* e *alfa*, não apresentando amplificação para o gene da toxina *beta*, confirmando a identidade da amostra de *C. perfringens* tipo D.

### 4.3. Padronização da PCR para amplificação do gene *etx*

O melhor resultado foi conseguido com uma PCR do tipo *nested*, obtendo um produto de 972 pb.

### 4.4. Expressão do gene *etx*

O produto da expressão do gene *etx* foi significativo quando comparado com o controle, como pode ser visto na figura.

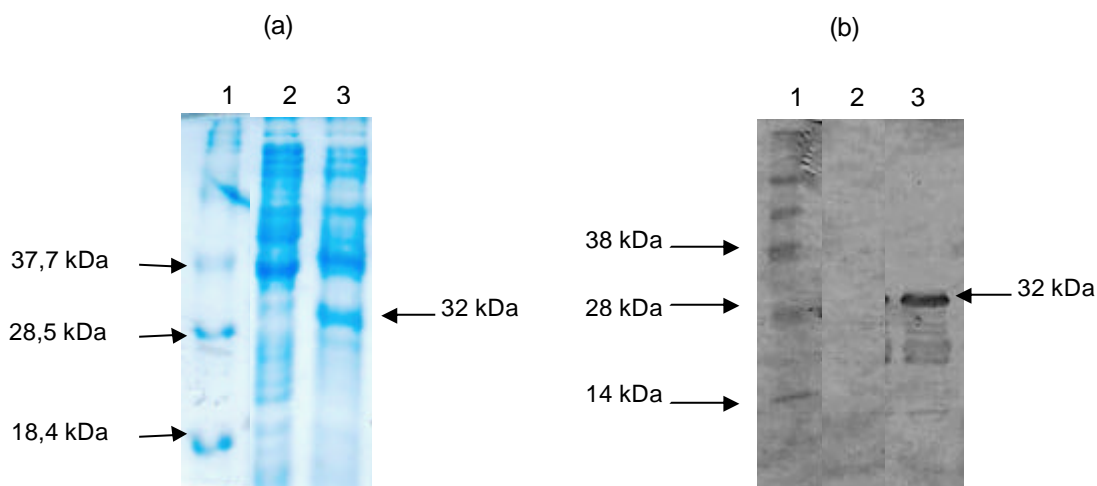


FIGURA – Expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D no sistema pET-11a. (a) SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- padrão de peso molecular; 2- *E. coli* BL21(DE3) sem plasmídeo/sem inserto após indução; 3- *E. coli* BL21(DE3) recombinante após indução. (b) *Western blot*; 1- padrão de peso molecular; 2- *E. coli* BL21(DE3) sem plasmídeo/sem inserto após indução; 3- *E. coli* BL21(DE3) recombinante após indução.

#### 4.5. Dosagem protéica e titulação da toxina recombinante

A toxina *épsilon* recombinante apresentou uma concentração protéica de aproximadamente 10 mg/mL e título de  $25 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL.

#### 4.6. Produção de soro antitoxina *épsilon* recombinante

Os níveis de antitoxina *épsilon* recombinante, utilizando como adjuvante suspensão em hidróxido de alumínio, com a toxina *épsilon* recombinante, mostrou após três doses, aos 37 dias, um título de 30 UI/mL. Após mais quatro doses, aos 169 dias, o título chegou a 80 UI/mL .

Esses resultados mostram que a toxina *épsilon* recombinante foi eficiente em produzir uma boa resposta imunológica em coelhos. Acredita-se que, com o esquema de imunização feito com adjuvante completo e incompleto de Freund, e, possivelmente, associado aos métodos de purificação dos anticorpos, os títulos obtidos seriam expressivamente superiores aos encontrados.

#### 4.7. Toxinotipia e soroneutralização cruzada

O tipo da toxina recombinante foi confirmado ser *épsilon*, pela neutralização com uma antitoxina padrão homóloga. O teste de soroneutralização cruzada mostrou que todos os camundongos inoculados com a mistura toxina recombinante e antitoxina nativa, e, toxina nativa e antitoxina recombinante, sobreviveram. Todos os animais inoculados com as misturas-controle morreram. Esses resultados confirmam a identidade antigênica da toxina *épsilon* recombinante produzida neste trabalho, com a toxina *épsilon* nativa.

#### 4.8. Teste de potência

O grupo I, imunizado com 200 µg da toxina recombinante, apresentou título de 40 UI/mL; o grupo II, imunizado com 100 µg, apresentou título de 30 UI/mL; e, o grupo III, imunizado com 50 µg, apresentou título de 10 UI/mL. Observa-se que os níveis de anticorpos neutralizantes obtidos apresentaram uma relação direta com a concentração da proteína recombinante empregada em cada grupo.

Considerando os níveis mínimos de aprovação de antitoxina *épsilon* de 5 UI/mL, pela Farmacopéia Européia, e de 2 UI/mL, pelo *Code Federal Regulation* (CFR), os níveis de anticorpos neutralizantes obtidos com a dose de 50 µg de toxina recombinante, a menor utilizada neste trabalho, ainda foram 2 vezes superiores àquele exigido pela Farmacopéia Européia e, 5 vezes superiores ao exigido pelo CFR. No Brasil, o teste de potência exigido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a aprovação do toxóide *épsilon* é o mesmo valor exigido pelo CFR, o que permitiria a utilização de níveis mais baixos da proteína recombinante. Os níveis de proteína empregados foram inferiores aos recomendados na preparação de referência internacional do toxóide *épsilon* de *C. perfringens*, utilizada para a padronização de vacinas contendo o toxóide *épsilon*, recomendada pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBISC). Cada dose de

toxina *épsilon* contém 9.192 µg da toxina nativa. Comparando esta quantidade com a menor dose utilizada neste trabalho, 50 µg, observa-se que foi utilizado uma quantidade 184 vezes menor que a contida no padrão de referência internacional, elicitando uma boa resposta nos animais imunizados.

## 5. CONCLUSÕES

A estratégia de clonagem e expressão de gene *etx*, que codifica a toxina *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D, em *Escherichia coli*, apresentou-se eficiente, produzindo altas concentrações de toxina recombinante, com identidade antigênica e farmacológica frente à toxina nativa.

A toxina *épsilon* recombinante produzida neste trabalho foi imunogênica, induzindo altos níveis de anticorpos em animais vacinados, mostrando-se forte candidata a uma vacina contra enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo D.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTY, I.; GLENNY, A.T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon-toxin and antitoxin. *Br. J. Exp. Pathol.*, v.28, p.110-126, 1947.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3ª ed. Saint Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.

GOSWANI, P.P., RUPA, P., PRIHAR, N.S., GARG, L.C. Molecular cloning of *Clostridium perringens* epsilon-toxin gene and its high level expression in *E. coli*. *Bioch. And Bioph. Res. Comunications*, v.226, p.735-40, 1996.

HUNTER, S.E., CLARKE, I.N., KELLY, D.C, TITBALL, R.W. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* épsilon toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infection immun.*, v.60, p.102-110, 1992.

LOBATO, F.C.F., MORO, E., UMEHARA, O. *et al.* Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.313-318, 2000.

REED, R.H., MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. *American Journal Hygiene*, v.27, p.493-497, 1938.

ROOD, J.I., McCLANE, B.A., SONGER, J.G., TITBALL, R.W. *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*, San Diego.: Academic Press, 1997, 533p.

SAMBROOK J. E RUSSEL D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, 720p.

TOWBIN, H., STAHELIN, T. AND GORDON, J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.76, p.4350, 1970.

UZAL, F.A., GLASTONBURY, J.R., KELLY, W.R., THOMAS, R. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet. Rec.*, v.141, n.9, p.224-6, 1997.

**Apoio:** FAPEMIG; CNPq.