

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES PARA O CONTROLE DA ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA

GIL de los SANTOS, J.R.^{1*}; CONCEIÇÃO, F.R.²; GIL-TURNES, C.³

1. INTRODUÇÃO

A Enterite Necrótica Aviária (ENA) é uma enterotoxemia aguda, que se apresenta em forma clínica ou sub-clínica, caracterizadas por produzir mortes ou redução na produtividade, respectivamente. Afeta principalmente animais jovens, entre duas e cinco semanas de idade, aparecendo subitamente, geralmente associada à imunossupressão (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000). Embora os casos de ENA não sejam reportados às autoridades sanitárias, é conhecido seu impacto negativo na produção avícola. Estimou-se que nos Estados Unidos o custo dessa doença foi de mais de U\$ 0.05 por animal (VAN DER SLUIS, 2000), podendo provocar prejuízos de até 33% na produção, principalmente devido ao aumento da conversão alimentar, redução do peso vivo e aumento na condenação de carcaças devido à colangio-hepatite (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001).

Considera-se que a ENA é causada por *Clostridium perfringens* A e C (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001), porém estudos sugerem que o sorotipo A é o principal agente da doença (ENGSTRÖM et al., 2003; HEIKINHEIMO & KORKEALA, 2005; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006). *C. perfringens* produz como antígeno maior a toxina α , uma fosfolipase com ação hemolítica, que foi relacionada com as lesões características da ENA (TITBALL et al., 1999; WILLIAMS, 2005), sendo considerada o principal fator de patogenicidade da bactéria (DAHIYA et al., 2006; KEYBURN et al., 2006; THOMPSON et al., 2006).

O controle da ENA foi baseado, nas últimas décadas, na administração de antibióticos na ração como promotores de crescimento (BRENNAN et al., 2001; KNARREBORG et al., 2002; BRENNAN et al., 2003). Entretanto, a interdição dessa prática, decretada pela União Européia (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003), lançou o desafio de criar novas estratégias para controlar a doença. Entre elas, vacinas contendo toxina α nativa ou recombinante de *C. perfringens* foram testadas com resultados variáveis. Mesmo que tenha sido relatado que animais que sobreviveram à doença desenvolveram imunidade (PRESCOTT, 2000), até 2007 não havia vacinas comerciais disponíveis (KULKARNI et al., 2007), porém atualmente está sendo comercializado um toxóide de *C. perfringens* A (Schering-Plough Animal Health Co.). Contudo, a produção industrial de toxóides a partir de *C. perfringens* é um processo laborioso. A clonagem do gene da toxina α (*cpa*) em *Escherichia coli* (LESLIE et al., 1989) possibilitou a utilização dessa tecnologia para o desenvolvimento de vacinas contra ENA. Este trabalho objetivou construir e avaliar vacinas de toxina α recombinante (rAT) para controlar Enterite Necrótica Aviária.

¹ Bolsista ProDoc CAPES, Faculdade de Veterinária, UFPel. Centro de biotecnologia, UFPel, Campus Universitário, CP 354, 96010-900, Pelotas-RS. *E-mail: gildelossantos@uol.com.br

² Centro de Biotecnologia, UFPel.

³ Faculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, UFPel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

DNA cromossomal de uma cepa de *C. perfringens* A isolada de um surto de campo foi extraído conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001). O gene foi amplificado por PCR, purificado e clonado no vetor pAE (Qiagen). O amplicon foi analisado em seqüenciador de DNA automático (MegaBACE 500, GE HealthCare, USA) e comparado com 100 referências do GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA). Cultura de *E. coli* TOP 10F (Invitrogen Corporation, CA, USA) competente foi transformada por eletroporação com o vetor recombinante. Os clones recombinantes foram selecionados em agar Luria Bertani (LB) contendo $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. As colônias recombinantes foram selecionadas e seus plasmídeos extraídos e purificados conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001). *E. coli* BL21 DE3 pLysS foi transformada com o plasmídeo recombinante purificado. Clones recombinantes foram cultivados em meio LB com ampicilina até a fase log ($\text{DO}_{600}=0,6-0,8$) e a cultura induzida com isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1mM durante 3 h a 37°C e 150 rpm. A expressão foi confirmada por SDS-PAGE 12% e por Western blot com anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina conjugado à peroxidase (Sigma). Após, a proteína obtida foi purificada através de cromatografia de afinidade no sistema AKTAPrime™ Plus (Amersham Bioscience, Alemanha) e submetida a diálise por 24h em PBS pH 7,4.

Camundongos *Balb-c* machos com seis semanas de idade foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco animais cada. Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. Cada vacina foi administrada a um grupo (tabela 1) via intramuscular (IM) as 8 e 11 semanas de vida. Os animais foram desafiados aos 49 dias pós-vacinação (pv) com 10 DL_{50} de toxina comercial (*C. perfringens* phospholipase C type I, Product Nº P7633, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) (sT) via intravenosa (IV). Coletaram-se amostras de sangue aos 0, 21, 35 e 49 dias pv, e seus níveis de anticorpos avaliados por ELISA usando sT como antígeno. Os resultados foram expressos em soroconversão dividindo a respectiva absorbância pela absorbância média de todos os animais no 0 dia pv.

Tabela 1: Vacinas administradas a cada grupo de camundongos.

Grupos	Antígeno	Adjuvante	Dose de antígeno (μg)
Controle	---	---	---
1	sT	$\text{Al}(\text{OH})_3$	25
2	sT	$\text{Al}(\text{OH})_3$	50
3	rAT	$\text{Al}(\text{OH})_3$	25
4	rAT	$\text{Al}(\text{OH})_3$	50

Para estimar a dose mínima protetora, vacinas contendo 25, 12.5, 6.25 e 3 μg de rAT foram injetadas via IM em duas doses com 21 dias de intervalo, em grupos de cinco animais cada. Aos 49 dias pv os animais foram desafiados com 10 DL_{50} de sT via IV.

Frangas Ross P8 de um dia de idade foram divididas aleatoriamente em grupos de cinco animais cada. Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. Cada vacina foi administrada a um grupo (tabela 2) via IM aos 7 dias de idade e, para aqueles que receberam duas doses, aos 14 dias de idade. Os animais foram alojados no mesmo ambiente. Coletaram-se amostras de sangue aos 0, 7, 21 e

35 dias pv, e seus níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA usando sT como antígeno. Os resultados foram expressos em soroconversão dividindo a respectiva absorbância pela absorbância média de todos os animais no dia 0 pv. Cada animal foi pesado aos 0 e 35 dias pv, e seu ganho de peso estimado.

Tabela 2: Vacinas administradas aos frangos.

Grupo	Dose de antígeno (µg)	Nº de doses
Controle	---	---
1	25	1
2	50	1
3	25	2
4	50	2

A significância das diferenças dos resultados foi estimada por ANOVA utilizando o programa *Statistix software 8 version* (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção industrial de toxina α de *C. perfringens* é um processo laborioso. Não obstante a tecnologia de produção de vacinas recombinantes abriu uma nova perspectiva para superar as dificuldades de obtenção de antígenos de cultivos de *Clostridium*. KULKARNI et al. (2007) demonstraram que a aplicação de duas doses de toxóide α de *C. perfringens* seguidas de um reforço de toxina ativa, protegeu frangos contra desafio. Nesse estudo utilizou-se um toxóide produzido a partir de toxina comercial, já que não foi possível obter toxina recombinante por ter sido tóxica para *E. coli* transformada. COOPER et al. (2008) desenvolveram uma vacina com toxina α recombinante que reduziu o escore médio de lesões de 2.37 para o grupo controle a 1.35 para animais vacinados, ainda que apenas 45.1% dos animais vacinados não apresentaram lesões após o desafio com *C. perfringens*. A falta de um protocolo oficial de reprodução experimental de ENA levou a que trabalhos que utilizaram desafio com *C. perfringens* apresentaram resultados variáveis. Devido a isso, o USDA utiliza um protocolo para a validação de vacinas, que exige que 80% dos animais vacinados devem sobreviver a um desafio de 10DL₅₀ de toxina que mate ao menos 80% dos controles (USDA, 2002). Esse protocolo foi utilizado em nosso experimento com camundongos, superando nossas vacinas as exigências desse teste.

Em nosso experimento a toxina α recombinante de *C. perfringens* foi produzida e purificada com êxito em *E. coli*. O seqüenciamento da rAT demonstrou pelo menos 99% de identidade com genes *cpa* de *C. perfringens* de 100 referências do GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA). A rAT tem massa molecular de 43.7 kDa, possui propriedades dermonecroticas e de fosfolipase, e uma DL₅₀ de 21.4 µg por via IV, correspondendo a 610 µg kg⁻¹ de peso vivo, enquanto a DL₅₀ da sT foi de 10.4 µg, equivalente a 298 µg kg⁻¹ de peso vivo, demonstrando que a toxina recombinante possui características similares a sT, porém com menor toxicidade.

Vinte e quatro horas após a primeira dose de vacina, 75% dos camundongos do grupo 2 morreram, devido a que foram inoculados com uma

dose vacinal de sT correspondente a 5 DL₅₀. Já as vacinas dos grupos 1, 3 e 4 foram inócuas e protegeram 100% dos animais (Tabela 3). Aos 49 dias pv as maiores soroconversões dos camundongos foram de 3.2 (grupo 1), 3.0 (grupo 4) e 2.9 (grupo 3) (Tabela 3). A dose mínima de rAT que protegeu 80% dos camundongos foi de 12.5 µg (83.3%).

Tabela 3: Soroconversão e índices de proteção dos camundongos aos 49 pv.

Grupos	Soroconversão	Proteção (%)
1- sT+Al(OH) ₃ 25 µg	3.2 ^a	100
3- rAT+Al(OH) ₃ 25 µg	2.9 ^a	100
4- rAT+Al(OH) ₃ 50 µg	3.0 ^a	100
Controle	0.8 ^b	0

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($\alpha=0.05$).

No experimento com frangos, o grupo controle apresentou soroconversão média de 5.6 aos 35 dias pv. Esta observação adicionada de uma redução significativa ($p<0.05$) no ganho de peso, levaram a concluir que houve um surto sub-clínico de ENA. Por outro lado, os animais vacinados que foram mantidos juntos aos controles, apresentaram soroconversões que variaram de 1.7 a 2.6, no mesmo período (Tabela 4), sugerindo que a vacina protegeu os animais da doença. A vacina também demonstrou ser inócua e incrementou o ganho de peso em 9.3, 8.7 e 7.6% nos animais vacinados, quando comparados ao controle (Tabela 4). No esquema de vacinação observou-se que a administração de duas doses associadas à maior dose de antígeno (grupo 4) afetou negativamente o ganho de peso gerando uma diminuição de 4.7%, provavelmente devido à ação da toxina recombinante, que não foi detoxificada para a produção das vacinas.

Tabela 4: Soroconversões e ganho de peso dos frangos.

Grupo	Dose de antígeno (µg)	Doses de vacina	Soroconversão	Ganho de peso	
				kg	%*
Controle	Nenhum	Nenhum	5.6 ^a	1.72 ^b	
1	25	1	2.6 ^b	1.88 ^a	+9.3
2	50	1	2.6 ^b	1.87 ^a	+8.7
3	25	2	2.1 ^b	1.85 ^a	+7.6
4	50	2	1.7 ^b	1.64 ^b	-4.7

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($\alpha=0.05$).

*Porcentagem comparado ao grupo controle.

4. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a toxina α recombinante de *C. perfringens* apresenta potencial para utilização como antígeno na produção de uma vacina contra a Enterite Necrótica Aviária.

Financiado pelo CNPq (auxílio 474509/04) e FAPERGS (auxílio 0523299).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRENNAN, J.; MOORE, G.; POE, S.E.; ZIMMERMANN, A.; VESSIE, G.; BARNUM, D.A.; WILSON, J. Efficacy of In-Feed Tylosin Phosphate for the Treatment of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.80, p.1451-1454, 2001.

BRENNAN, J.; SKINNER, J.; BARNUM, D.A.; WILSON, J. The Efficacy of Bacitracin Methylene Disalicylate when Fed in Combination with Narasin in the Management of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.82, n.3, p.360-363, 2003.

COOPER K.K.; TRINH H.T.; SONGER J.G. 2008. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. **Veterinary Microbiology**. Artigo no prelo. Acessado em 15 ago. 2008. Disponível em www.sciencedirect.com

COUNCIL OF EUROPEAN UNION. Council Regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. 2003. Acessado em 17 out. 2003. Disponível em <<http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>>

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

ENGSTRÖM, B.E.; FERMÉR, C.; LINDBERG, A.; SAARINEN, E.; BÅVERUD, V.; GUNNARSSON, A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Veterinary Microbiology**, v.94, n.3, p.225-235, 2003.

GHOLAMIANDEKHORDI A.R.; DUCATELLE, R.; HEYNDRIKX, M.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.1-2, p.143-152, 2006.

HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.407-411, 2005.

KEYBURN, A.L.; SHEEDY, S.A.; FORD, M.E.; WILLIAMSON, M.M.; AWAD, M.M.; ROOD, J.I.; MOORE, R.J. The alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, n.11, p.6496-6500, 2006.

KNARREBORG, A.; SIMON, M.A.; ENGBERG, R.M.; JENSEN, B.B.; TANNOCK, G.W. Effects of Dietary Fat Source and Subtherapeutic Levels of Antibiotic on the Bacterial Community in the Ileum of Broiler Chickens at Various Ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n. 12, p.5918-5924, 2002.

KULKARNI, R.R.; PARREIRA, V.R.; SHARIF, S.; PRESCOTT, J.F. *Clostridium perfringens* Antigens Recognized by Broiler Chickens Immune to Necrotic Enteritis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.12, p.1358-1362, dec, 2006.

LESLIE, D.; FAIRWEATHER, N.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; KEHOE, M. Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C. **Molecular Microbiology**, v.3, n.3, p.383-392, 1989.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v.30, p.73-8, 2001.

PRESCOTT, J. Vaccine-Based Control of Necrotic Enteritis of Broiler Chickens. **Ministry of Agriculture and Food**, Ottawa, Canada, 2000. Acessado em 23 jan. 2004. Disponível em
<<http://www.omaf.gov.on.ca/english/livestock/poultry/facts/necrente.htm>>

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**, Third Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ISHI, M. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI Jr, A., MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. Cap. 4.6, p.242-243.

THOMPSON, D.R.; PARREIRA, V.R.; KULKARNI, R.R.; PRESCOTT, J.F. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.1-2, p.25-34, 2006.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Conditional Licenses for Products Containing *Clostridium perfringens* Type A**. Center for Veterinary Biologics Notice Nº 02-25 2002. Acessado em 28 mar. 2007. Disponível em
<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/notice_02_25.pdf>

VAN DER SLUIS, W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. **World Poultry**, v.16, n.7, p.42-43, 2000.

WILLIAMS, R.B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathology**, v.34, n.3, p.159-180, 2005.