

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE DUAS VACINAS RECOMBINANTES PARA A PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* EM LEITÕES

Isabela Pádua Zanon^{1*}, Carolina Pantuzza Ramos², Rafael Gariglio Clark Xavier², Thayanne Gabryelle Viana de Souza², Victor Santos do Amarante², Rodrigo Otávio Silveira Silva³.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: paduaisabela@gmail.com

²Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³ Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

Clostridioides difficile é um bacilo gram-positivo, anaeróbio estrito e formador de esporos, com elevada resistência e capacidade de disseminação pelo ambiente⁴. Considerado um patógeno emergente, *C. difficile* tem sido reconhecido como importante agente bacteriano em humanos e animais³. Estudos recentes descrevem a possível atuação de animais domésticos e silvestres como reservatórios para seres humanos, sugerindo o potencial zoonótico desse agente, reforçado pela alta similaridade genética entre os isolados⁵.

A infecção por *C. difficile* (ICD) é de grande relevância em suínos, constatada pelo seu importante papel na diarreia neonatal, que ocorre predominantemente em leitões com até 7 dias de idade⁶. A ICD em suínos neonatos é de ocorrência mundial, caracterizada clinicamente por colite, edema de mesocólon, diarreia e crescimento corporal reduzido⁷, ocasionando impactos na produtividade dos leitões, destacado como principal prejuízo relacionado à disseminação do agente entre os plantéis. A susceptibilidade dos leitões à ICD está correlacionada com a microbiota imatura, maior presença de sais biliares primários, além da existência de receptores para os principais fatores de patogenicidade de estirpes toxigênicas de *C. difficile*, as toxinas A (TcdA) e B (TcdB)^{6,8}.

Quanto ao controle da enfermidade, devido à capacidade de esporulação do patógeno, ações de descontaminação e eliminação são indicadas como medidas auxiliares para conter a disseminação¹. Entretanto, a sua completa eliminação, especialmente da forma esporulada, dificilmente ocorre, demandando que as medidas de higiene sejam acompanhadas de ações imunoproliféricas para prevenção da infecção dos animais susceptíveis⁷.

Considerando a ausência de métodos imunoproliféricos compostos por proteínas recombinantes, tecnologia sabidamente vantajosa para produção industrial², o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de duas vacinas a partir de fragmentos imunogênicos das toxinas A e B de *C. difficile* para a prevenção da infecção em leitões, bem como a avaliação da imunização ativa e passiva dos suínos inoculados.

METODOLOGIA

À procura de um potencial imunógeno que induzisse proteção contra os principais fatores de virulência de *C. difficile*, estudos avaliaram a antigenicidade de diferentes porções das toxinas A e B. Observou-se elevada imunogenicidade dos fragmentos C-terminal, denominados *combined repetitive oligopeptide* (CROP), responsáveis pela ligação das toxinas aos receptores presentes no epitélio intestinal. Nesse sentido, para a síntese da vacina recombinante bivalente, composta por fragmentos de TcdA e de TcdB (AB), bem como produção de uma quimera (Q), contendo a junção dos fragmentos presentes na vacina bivalente, foram selecionadas regiões previamente caracterizadas como imunodominantes. Em sequência, foi elaborado o plasmídeo contendo as regiões imunorreativas que foi, então, inserido aos hospedeiros de expressão *Escherichia coli* Artic Express (DE3) e BL21 por transformação bacteriana, a fim de que ocorresse a expressão das proteínas recombinantes.

Após a realização de testes de esterilidade, inocuidade e comprovação da resposta humoral em coelhos, os imunógenos foram liberados para avaliação na espécie-alvo (suínos). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo nº 277/2020.

O estudo foi composto por três grupos experimentais contendo 6 matrizes suínas cada: (I) controle (salina estéril 0,85%); (II) tratamento AB e (III) tratamento Q, sendo a dose utilizada de 20 µg, em adição a 100 µg de hidróxido de alumínio. Os animais foram imunizados via intramuscular, na 6ª e 3ª semana antecedentes ao parto. Anterior às inoculações,

aproximadamente 10 mL do sangue de cada matriz foi coletado pela veia jugular para obtenção do soro.

As matrizes tiveram os seus partos assistidos e os leitões conduzidos a colostragem após a cura de seus umbigos e devida marcação. Em até 72 horas após o nascimento, seis leitões foram aleatoriamente selecionados de cada matriz, para que a coleta sanguínea das veias cefálica e/ou jugular fossem realizadas. A coleta sanguínea das matrizes também foi realizada, para obtenção do soro, detecção e titulação dos anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

A leitura do ELISA indireto foi realizada mediante absorvância de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes com o uso de espectrofotômetro e as análises dos dados referentes a resposta imune das matrizes e leitões neonatos ocorreu com o teste de Kruskal-Wallis, com exceção dos títulos de anticorpos em soro obtido das matrizes, que por apresentarem distribuição normal, foram analisados por ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os tempos (T0, T1 e T2) foram observados títulos de anticorpos estatisticamente diferentes entre todos os grupos em relação ao antígeno TcdA, com matrizes imunizadas com a vacina quimérica apresentando maiores títulos de anticorpos (Fig. 1). Em relação ao antígeno TcdB, assim como demonstrado também para TcdA, as matrizes inoculadas com ambos os imunizantes (AB e Q), apresentaram títulos de anticorpos similares e estatisticamente superiores ao grupo controle (Fig. 1).

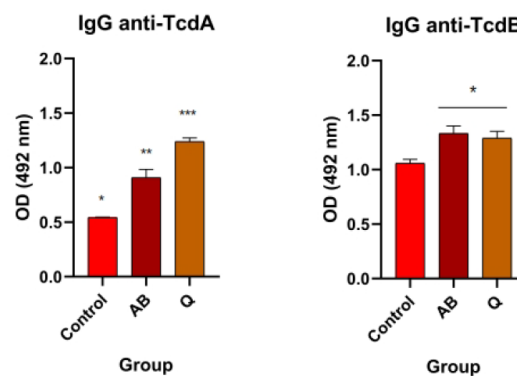


Figura 1: Absorvância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes dos grupos de matrizes suínas controle e imunizadas com as vacinas bivalente (AB) e quimera (Q) avaliados por ELISA indireto (Fonte Autoral).

Os leitões passivamente imunizados contra as toxinas A e B de *C. difficile* via colostro apresentaram títulos de anticorpos superiores aos animais do grupo controle analisando-se ambos os antígenos TcdA e TcdB (Fig. 2).

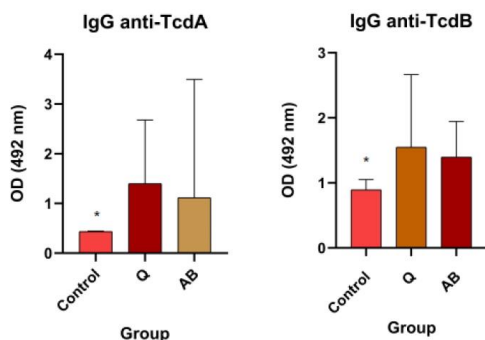


Figura 2: Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes dos grupos de leitões controle e imunizados com as vacinas bivalente (AB) e químera (Q) avaliados por ELISA indireto (Fonte Autoral).

Comparou-se ainda, os títulos de anticorpos detectados nas matrizes suínas nos tempos 1 e 2 e nos leitões neonatos. Assim como as análises anteriores, os animais do grupo controle apresentaram títulos de anticorpos contra os antígenos recombinantes A e B inferiores aos demais grupos (Fig. 3), demonstrando a capacidade de indução de anticorpos por ambas as vacinas desenvolvidas. Ainda, que mesmo sem apresentarem diferenças estatísticas entre si, torna a vacina Q uma boa opção para síntese em escala industrial, em função da formulação de um só produto.

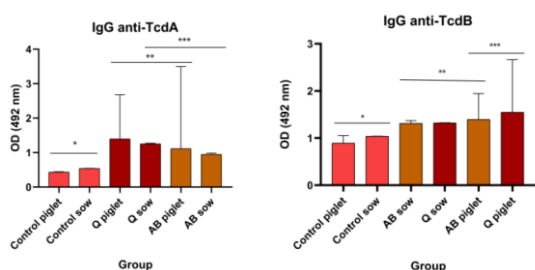


Figura 3: Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de leitões e matrizes suínas controle e imunizados com as vacinas bivalente (AB) e químera (Q) avaliados por ELISA indireto (Fonte Autoral).

Por fim, é possível sugerir que a inoculação em duas doses de 20 µg da vacina recombinante Q, juntamente ao adjuvante hidróxido de alumínio em matrizes suínas ao final de gestação, seja capaz de induzir uma resposta imune humoral contra as toxinas A e B de *C. difficile*. Além disso, que anticorpos contra as toxinas no soro desses animais são passivamente transferidos aos leitões neonatos por meio da colostragem e absorvidos pelo epitélio intestinal em suas primeiras horas de vida, demonstrado pela presença de IgG anti-TcdA e anti-TcdB séricos com até 72h após o nascimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou a capacidade indutora de reposta imune em matrizes suínas vacinadas com os antígenos recombinantes produzidos. Ademais, foi observada a transferência passiva de imunidade via colostro aos leitões.

Estudos futuros são necessários para avaliar a atividade neutralizante das imunoglobulinas detectadas nos leitões contra às toxinas A e B de *C. difficile*, somada a avaliação da capacidade de conferir proteção aos animais expostos ao agente toxigênico e/ou seus fatores de virulência. A obtenção de uma vacina recombinante eficaz para prevenção ou controle da infecção por *C. difficile* em leitões significaria um importante avanço na produção suína nacional e internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTYN, W. et al. Inactivation of Spores and Vegetative Forms of Clostridioides difficile by Chemical Biocides: Mechanisms of Biocidal Activity, Methods of Evaluation, and Environmental Aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 750, 10 jan. 2022.
- CID, R.; BOLIVAR, J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1072, jul. 2021.
- CURRY, S. R. Clostridium difficile. **Clin Lab Med**, 37, p. 341-369, 2017.
- CZEPIEL, J. et al. Clostridium difficile infection: review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.38, n. 7, p.1211-1221, jul. 2019.
- KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic Delineation of Zoonotic Origins of Clostridium difficile. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 164, jun. 2019.
- PROCTOR, A. et al. Neonatal Piglets Are Protected from Clostridioides difficile Infection by Age-Dependent Increase in Intestinal Microbial Diversity. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e01243-21, 31 out. 2021.
- SILVA, R. O. S.; GUEDES, R. M. DE C.; LOBATO, F. C. F. Clostridium difficile infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 73–80, nov. 2012.
- SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. Clostridium difficile: An important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006.

APOIO:

