

**PRIMEIRO ESTUDO SOBRE A POTÊNCIA DA VACINA COMERCIAL PARA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* EM LEITÕES**

Isadora Maria Soares de Melo<sup>1\*</sup>, Victor Santos do Amarante<sup>2</sup>, João Victor Ferreira Campos<sup>3</sup>, Thayanne Gabryelle Viana de Souza<sup>2</sup>, Yasmin Gonçalves de Castro<sup>2</sup>, Rodrigo Otávio Silveira Silva<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG– Belo Horizonte/MG – Brasil – \*Contato: isamelo2740@gmail.com

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

<sup>3</sup>Discente no Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG- Belo Horizonte/MG- Brasil

<sup>4</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

**INTRODUÇÃO**

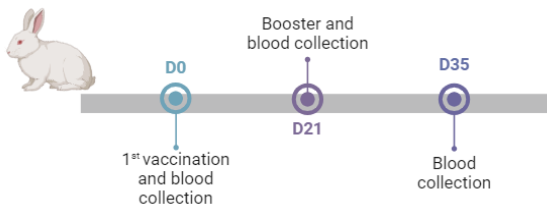
*Clostridioides difficile* é uma bactéria anaeróbia, capaz de formar esporos, comumente associada a casos de diarreia em humanos e animais, por meio da produção das toxinas A e B. Esse patógeno é importante para suínos na primeira semana de vida, sendo uma das principais causas de diarreia neonatal<sup>1-3</sup>. Ademais, anorexia, diminuição no ganho de peso, edema de mesocolón, ascite, febre, hidrotórax e desidratação são sinais clínicos que podem ser observados nos leitões infectados, gerando perdas econômicas<sup>2,4</sup>.

A similaridade entre os isolados de seres humanos e suínos sugere uma possível transmissão zoonótica do agente, reforçando a relevância da prevenção da doença nos animais no contexto da saúde única<sup>5,6</sup>. Mesmo sendo associado a casos de diarreia, esse patógeno é capaz de colonizar o trato gastrointestinal de mamíferos. Assim, o controle da doença é desafiador<sup>2,7</sup>.

Foi comprovado que a presença de anticorpos pode reduzir ou evitar os sinais clínicos ocasionados pela infecção por *C. difficile*. Apesar de sua importância para humanos e animais, existem poucas estratégias para prevenção desse agente<sup>8-10</sup>. Até o momento, não há vacinas para seres humanos e existe apenas uma vacina comercial para suínos, produzida com os toxoides A/B. Porém, sua potência na espécie-alvo nunca foi testada. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a potência da primeira vacina comercial contra *C. difficile* em suínos.

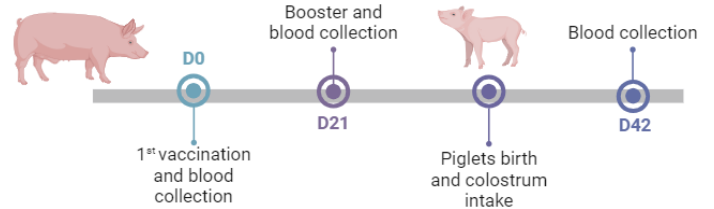
**METODOLOGIA**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (277/2020 e 184/2022). Seguindo o *Code of Federal Regulations* 9 para antígenos clostridiais<sup>11</sup>, 22 coelhos foram divididos em três grupos: (I) oito animais vacinados com metade da dose recomendada da vacina comercial; (II) oito animais imunizados com a dose indicada pelo fabricante e (III) seis animais no grupo controle. Todos os animais receberam duas doses com intervalos de 21 dias. Foi coletado sangue dos animais antes de cada vacinação e 14 dias após a última dose (Fig. 1).



**Figura 1:** Esquema de vacinação e coleta de sangue de coelhos (Fonte: Arquivo pessoal).

Para o teste de potência em suínos, foram utilizados dois grupos de matrizes gestantes: (I) grupo controle com seis animais; (II) grupo com 12 matrizes que receberam a vacina contendo os toxoides A/B de *C. difficile*. Os animais foram imunizados às 6 e 3 semanas antes do parto, sendo realizada coleta de sangue antes de cada imunização. 24 horas após o parto e ingestão do colostro pelos leitões, foram coletadas amostras de sangue das matrizes e de seis leitões selecionados aleatoriamente de cada ninhada (Fig. 2).

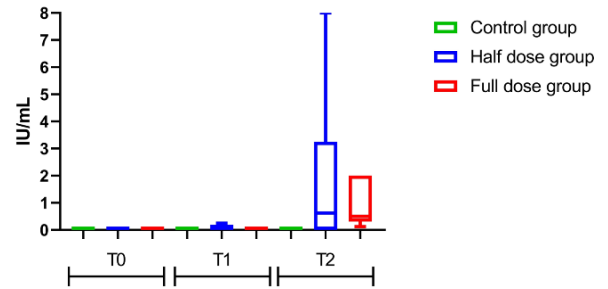


**Figura 2:** Esquema de vacinação e coleta de sangue dos suínos (Fonte: Arquivo pessoal).

Todas as amostras de soro foram submetidas a soroneutralização celular. As toxinas nativas A e B de *C. difficile* foram produzidas a partir do método da diálise<sup>12</sup>, utilizando uma cepa pertencente ao ribotipo 078.

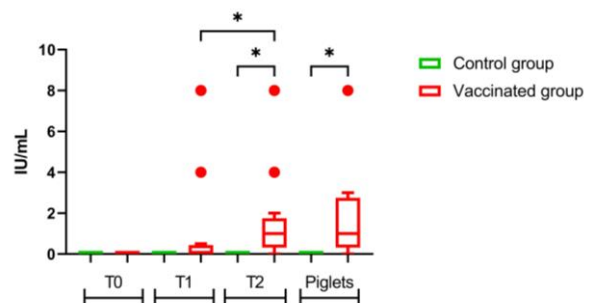
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos coelhos, foi observada a produção de anticorpos neutralizantes em ambos os grupos vacinados (médias de: 1.78±0.11 UI/mL para o grupo I; 0.98±0.85 UI/mL para o grupo II; Fig. 3). Não existem valores de referência para esse parâmetro, que poderiam prever a eficácia clínica das vacinas contra *C. difficile*.



**Figura 3:** Anticorpos neutralizantes nos coelhos (Fonte: Arquivo pessoal).

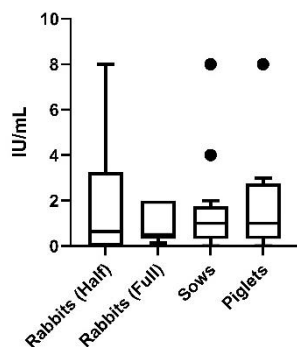
Em relação às matrizes suínas, 80% dos animais imunizados apresentaram soroconversão após a segunda dose da vacina (1.60±2.29 UI/mL). Os leitões de matrizes vacinadas apresentaram 1.74±2.22 UI/mL de anticorpos neutralizantes (Fig. 4). Nenhuma amostra dos grupos controle em ambas as espécies apresentou atividade neutralizante. Foi observada uma correlação de 91,5% entre os títulos de anticorpos das porcas e seus respectivos leitões. Isso mostra que os anticorpos gerados nas matrizes podem ser transferidos passivamente aos leitões. Esse achado é muito importante, uma vez que outros estudos relataram que transferência passiva de anticorpos monoclonais humanos e de colostro hiperimune bovino podem proteger a mucosa intestinal de leitões e prevenir a ação das toxinas<sup>13,14</sup>.



**Figura 4:** Anticorpos neutralizantes nos suínos (Fonte: Arquivo pessoal).



Não houve diferença significativa na quantificação de anticorpos neutralizantes entre os diferentes grupos testados (Fig. 5). Assim, os coelhos podem ser utilizados estrategicamente para o estudo de vacinas de *C. difficile*. Outros estudos já observaram uma relação entre a resposta imune de coelhos e bovinos contra outros agentes virais e toxinas clostridiais<sup>15,16</sup>. Porém, esse é o primeiro estudo que avaliou a resposta imune dos coelhos e suínos.



**Figura 5:** Comparação dos anticorpos neutralizantes entre os diferentes grupos (Fonte: Arquivo pessoal).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vacina comercial contra *C. difficile* é capaz de produzir uma resposta humoral contra as toxinas A e B em fêmeas suínas. Ademais, esses anticorpos podem ser transferidos passivamente para os leitões. Coelhos podem ser utilizados em estudos de desenvolvimento de vacinas para os suínos. É importante que futuros estudos avaliem a eficácia dos toxóides A e B.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PROCTOR, A. et al. Neonatal Piglets Are Protected from *Clostridioides difficile* Infection by Age-Dependent Increase in Intestinal Microbial Diversity. *Microbiology Spectrum*, v. 9, p. e01243-21, ago 2021.
2. LAWSON, P. et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O' Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, v. 40, p. 95-99, jun 2016.
3. GRZESKOWIAK, L. A. et al. Impact of early-life events on the susceptibility to *Clostridium difficile* colonisation and infection in the offspring of the pig. *GUT MICROBES*, v. 10, p. 251-259, ago 2019.
4. GRZESKOWIAK, L. A. et al. *Clostridioides difficile*-mesocolonic oedema in neonatal suckling piglets develops regardless of the fibre composition in sow's diets. *Animal*, v. 17, p. 100697, fev 2023.
5. LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T.V. *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, p. 857-863, nov 2019.
6. GOORHUIS, A. et al. Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, p. 1162-1170, set 2008.
7. GRZESKOWIAK, L.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. Determination of the extent of *Clostridium difficile* colonisation and toxin accumulation in sows and neonatal piglets. *Anaerobe*, v. 40, p. 5-9, ago 2016.
8. SOLOMON, K. A. The host immune response to *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 1, p. 19-35, fev 2013.
9. CZEPIEL, J. A. *Clostridium difficile* infection: review. *Springer*, v. 7, p. 1211-1221, abr 2019.

10. KYNE, L. A. et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *The Lancet*, v. 357, p. 189-193, jan 2001.

11. EUA, Code of Federal Regulations 9, 2005. Disponível em: < <https://www.ecfr.gov/current/title-9> >.

12. FU, S. A. et al. Simplified purification method for *Clostridium difficile* toxin A. *World Journal of Gastroenterology*, v. 10, p. 2756-2758, set 2004.

13. COHEN, O. A. et al. Systemically Administered IgG Anti-Toxin Antibodies Protect the Colonic Mucosa during Infection with *Clostridium difficile* in the Piglet Model. *PLoS ONE*, v. 9, p. e111075, out 2014.

14. STEELE, J. A. et al. Antibody Against TcdB, but Not TcdA, Prevents Development of Gastrointestinal and Systemic *Clostridium difficile* Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, p. 323-330, jan 2013.

15. CAO, Z. A. et al. Establishment of a method for evaluation of the efficacy of a classical swine fever virus subunit vaccine in rabbits. *Am J Vet Res*, v. 81, p. 521-526, jun 2020.

16. SAADH, M. A. et al. Immunogenicity of a newly developed vaccine against *Clostridium perfringens* alpha-toxin in rabbits and cattle. *Veterinary World*, v. 15, p. 1617-1623, jul 2022.

APOIO:

