

Avaliação de vacinas recombinantes tetravalentes contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*

MIGUEL ANDRADE BILHALVA; JAQUELINE FREITAS MOTTA; MARCOS ROBERTO A. FERREIRA; ANA VITÓRIA COSTA; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO

Universidade Federal de Pelotas – miguel.bilhalva@ufpel.edu.br

Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As clostridioses são doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium spp.*, estas enfermidades de rápida progressão e alta letalidade são de grande incidência em animais de produção no Brasil, causando impacto econômico ao setor pecuarista. *Clostridium spp.* é um gênero de bactérias, de morfologia bacilar, coloração gram positiva e capazes de esporular, característica que confere a elas a capacidade de se manter latentes no solo ou trato gastrointestinal de seus hospedeiros por grandes períodos de tempo, conservando sua viabilidade (LOBATO et al, 2013).

Dentre as bactérias de maior interesse deste gênero, estão o *C. botulinum* e *C. perfringens*, que apresentam como via de infecção comum alimentos contaminados com seus esporos ou toxinas. Geralmente é através da ingestão de seus esporos que estes microrganismos alcançam o trato gastrointestinal dos hospedeiros, possibilitando a sua replicação e produção das toxinas responsáveis pelas enfermidades que causam, entretanto, a ingestão de toxinas pré-formadas de *C. botulinum* também é responsável por causar botulismo. *C. botulinum* é o agente causador do botulismo, doença neuromuscular causada pela ação de suas toxinas. Dos sete sorotipos imunologicamente distintos das neurotoxinas de *C. botulinum* (BoNTs), os tipos C e D, assim como combinações quiméricas de ambos, são responsáveis pela maioria das infecções em animais. Após sua expressão, as BoNTs agem nas junções neuromusculares do hospedeiro, interrompendo a liberação de acetilcolina e causando paralisia flácida (LOBATO et al, 2013).

Já o *C. perfringens* é conhecido pela grande variedade de toxinas que produz e é classificado em sete toxonotipos (A - G), de acordo com a capacidade de expressão de toxinas (alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina e NetB). Sendo o agente causador de diversas doenças de relevância veterinária, como a gangrena gasosa e a enterotoxemia, o *C. perfringens* tem como principal causa destas doenças as toxinas alfa, beta e épsilon (FERREIRA et al, 2016).

Devido as características de rápida progressão e letalidade das clostridiose, a única alternativa viável para o seu controle vem a ser a profilática através da vacinação. Entretanto, as vacinas desenvolvidas nos últimos anos para a imunização contra estes agentes, são baseadas em toxoides inativados com formaldeído, o que agrega uma série de desvantagens de produção, como o risco

de biossegurança e o laborioso processo de inativação. Neste cenário, antígenos recombinantes produzidos em cepas de *Escherichia coli*, vêm ganhando visibilidade por minimizarem muitas das desvantagens de produção inerentes ao método convencional, como o alto risco de biossegurança e o laborioso processo de inativação já citados (FERREIRA et al, 2016; MOREIRA et al, 2018).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar uma vacina recombinante tetravalente contra toxinas de *C. perfringens* e *C. botulinum* em ovinos. Duas formulações desta vacina foram avaliadas, ambas contendo as toxinas beta (rCPB) e épsilon (rETX) de *C. perfringens* e as neurotoxinas C e D de *C. botulinum*, porém, uma das formulações apresentava estes antígenos na forma de proteína purificada e a outra em bacterinas de *E. coli*. Após a vacinação, as formulações foram avaliadas por ensaio de soroneutralização em camundongo.

2. METODOLOGIA

Os antígenos foram produzidos e quantificados conforme anteriormente descrito por FERREIRA et al. (2016 e 2019) e MOREIRA et al. (2018 e 2020). Estes foram misturados em suas respectivas formulações (purificado ou bacterina) e adsorvidos em 15% (v/v) de $Al(OH)_3$.

Para a vacinação, foram utilizados 18 ovinos de raça Texel, de aproximadamente 11 meses de idade, os animais apresentavam condições corporais e genéticas homogêneas e não haviam sido vacinados anteriormente ao estudo. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (G1, G2 e G3), compostos respectivamente por: 7 cordeiros vacinados com a formulação composta pelas bacterinas recombinantes em $Al(OH)_3$; 6 cordeiros vacinados com a formulação contendo os antígenos recombinantes purificados em $Al(OH)_3$ e 5 cordeiros vacinados com a vacina comercial multivalente, Resguard (Biovet Vaxxinova, Brasil). Ambas as formulações recombinantes continham 200 µg de cada antígeno e as vacinas foram administradas em duas doses, com intervalo de 28 dias.

O sangue dos animais foi coletado por punção da veia jugular utilizando-se tubos do tipo Vacuplast® e os soros foram obtidos por centrifugação do sangue (3.000 × g, 10 min) e utilizados para o ensaio de soroneutralização.

Resumidamente, 1 mL de cada toxina (NIBSC, UK) foi incubada (37 °C, 1 h) com 1 mL de diluição em série de cada soro, de 1:1 até 1:32. Então, 5 camundongos foram inoculados intraperitonealmente e observados por 72 h para sobrevivência e sacrifício se necessário. O procedimento foi repetido com diluições intermediárias de cada soro para identificar a diluição protetora inferior. As informações de sobrevivência foram usadas para calcular os resultados em unidades internacionais por mililitro (UI / mL).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que os níveis mínimos de anticorpos neutralizantes, produzidos após a vacinação contra as toxinas beta, épsilon, C e D, são respectivamente 10, 2, 5 e 2 UI/mL para que a vacina seja aprovada quanto a sua eficácia. Sendo assim, na análise dos resultados obtidos pelo ensaio de soroneutralização realizado neste estudo,

utilizou-se destes parâmetros. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, é possível observar que os antígenos recombinantes tiveram desempenho semelhante ao da vacina convencional, tendo como exceção o caso da antitoxina D, cujo antígeno recombinante apresentou um desempenho superior ao da vacina convencional em ambas as formulações em que foi apresentado.

Tabela 1. Potencial imunogênico das formulações avaliadas.

Grupos	Formulações Vacinais	Títulos de antitoxinas (UI/mL)			
		Anti-CPB(UI/mL)	Anti-ETX (UI/mL)	Anti-C (UI/mL)	Anti-D (UI/mL)
G1	Bacterinas recombinantes	≤ 10	≥ 2	≤ 1	5
G2	Proteínas purificadas	≤ 10	≥ 2	≤ 1	10
G3	Vacina comercial	≤ 10	≤ 2	≤ 1	≤ 1

Os valores mínimos contra as toxinas beta e épsilon são respectivamente 10 e 2 UI/mL e para as toxinas C e D, respectivamente 5 e 2 UI/mL de acordo com o MAPA.

As formulações recombinantes, bacterinas e proteínas purificadas, apresentaram resultados semelhantes, divergindo apenas quanto a toxina D, onde o antígeno purificado demonstrou resultado superior. Entretanto, vale ressaltar que a utilização de bacterinas de *E. coli* recombinante na composição vacinal agrega vantagens ao processo de produção, levando em conta que elimina as etapas de lise celular e purificação dos antígenos, reduzindo o tempo, custo e a complexidade do processo de produção destas vacinas (FERREIRA et al, 2019; MOREIRA et al, 2020).

De acordo com este ensaio, ambas as formulações da vacina recombinante foram capazes de induzir imunidade protetora contra as toxinas CPB e ETX de *C. perfringens* e o sorotipo D de *C. botulinum*, enquanto a vacina comercial teve eficácia relatada apenas quanto as toxinas de *C. perfringens*, indicando uma possível vantagem das formulações recombinantes não apenas no processo de produção, como também na sua capacidade de proteção.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que os antígenos recombinantes apresentam potencial para compor uma vacina multivalente contra *C. botulinum* e *C. perfringens*, além disso, conclui-se que as bacterinas de *E. coli* não impactaram de forma negativa no desempenho dos antígenos recombinantes, podendo ser consideradas então como uma alternativa promissora para a produção de uma formulação vacinal mais simples que preserve a eficácia dos antígenos, levando em conta seu impacto na cadeia de produção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LOBATO, F.C.F; SALVARANI, F.M; GONÇALVES, L.A; PIRES, P.S; SILVA, R.O.S; ALVES, G.G; NEVES, M; OLIVEIRA, C.A.JR; PEREIRA, P.L.L. Clostridioses dos animais de produção. **Vet. e Zootec.** Belo Horizonte. v. 20, P. 29 - 48, 2013.
2. MOREIRA JR, C; FERREIRA, M.R.A; DA CUNHA, C.E.P; DONASSOLO, R.A; FINGER, P.F; MOREIRA, G.M.S.G; OTAKA, D.Y; DE SOUZA, L.A; BARBOSA, J.D; MOREIRA, A.N; SALVARANI, F.M; CONCEIÇÃO, F.R. Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle. **Toxin**, v. 10, n. 381, 2018.
3. MOREIRA JR, C; FERREIRA, M.R.A; FINGER, P.F; MAGALHÃES, C.G; CUNHA, C.E.P; RODRIGUES, R.R; OTAKA, D.Y; GALVÃO, C.C; SALVARANI, F.M; MOREIRA, A.N; CONCEIÇÃO, F.R. Protective efficacy of recombinant bacterin vaccine against botulism in cattle. **Vaccine**, v. 38, n. 11, p. 2519 – 2526, 2020.
4. FERREIRA, M. R. A; MOTTA, J. F.; AZEVEDO, M. L.; DOS SANTOS, L. M.; MOREIRA JR, C.; RODRIGUES, R. R.; DONASSOLO, R. A.; REIS, A. S. B.; BARBOSA, J. D.; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Inactivated recombinant Escherichia coli as a candidate vaccine against Clostridium perfringens alpha toxin in sheep. **Anaerobe**, v. 59, p. 163 - 166, 2019.
5. FERREIRA, M. R. A.; MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; MENDONÇA, M; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Recombinante Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of Clostridium perfringens: Production Strategies and applications as Veterinary Vaccines. **Toxins**, v. 8, n. 340, 2016.