

## AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE POTENCIAIS ANTÍGENOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA.

CLEIDERSON LIMA AGUIRRES<sup>1</sup>; CLEIDEANNY CANCELA GALVÃO<sup>2</sup>; PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN<sup>3</sup>; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES<sup>4</sup>; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA<sup>5</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – [cleidersonlag@gmail.com](mailto:cleidersonlag@gmail.com)

<sup>2</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – [annymedvet@gmail.com](mailto:annymedvet@gmail.com)

<sup>3</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – [quatrinp@gmail.com](mailto:quatrinp@gmail.com)

<sup>4</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – [rafaelr458@gmail.com](mailto:rafaelr458@gmail.com)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL - [marcosferreiravet@gmail.com](mailto:marcosferreiravet@gmail.com)

<sup>6</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A Enterite Necrótica Aviária (ENA) é uma doença grave que afeta o sistema digestório das aves, causada pela bactéria *Clostridium perfringens* G. Esta enfermidade tem um impacto significativo na avicultura industrial global, causando perdas econômicas anuais de cerca de US\$6 bilhões (FATHIMA et al., 2022; ALI et al., 2017).

Nos ambientes de criação, ENA acomete principalmente aves com 2 a 6 semanas de idade e está relacionada a fatores que desequilibram a microbiota intestinal e/ou diminuem a imunidade das aves (SANTOS, CONCEIÇÃO et al., 2008). Nesse cenário, a restrição no uso de antibióticos como promotores de crescimento (APC), devido aos riscos associados a microrganismos multidroga resistentes (MDR) e às preocupações de saúde pública, tem contribuído para o aumento de surtos de ENA (COUNCIL OF EUROPEAN UNION, 2003; MARTIN et al., 2015).

Como resposta, a vacinação emerge como uma estratégia viável e promissora para controlar e prevenir a propagação do patógeno, ao mesmo tempo que reduz o uso indiscriminado de antibióticos. No entanto, apesar de alguns estudos terem explorado algumas estratégias de protótipos vacinais contra a ENA, a maior parte dos resultados tem se restringido a uma proteção parcial (LEE et al., 2015, M'SADEQ et al., 2015). Além disso, as plataformas de produção utilizadas e os custos associados a essas tecnologias tornam inviável a fabricação e a comercialização desses insumos.

Na prática pelo menos dois antígenos parecem ser necessários para promover proteção imunológica parcial, sugerindo a necessidade de pesquisar e desenvolver vacinas que proporcionem uma resposta imunoprotetora eficaz contra a diversidade de moléculas envolvidas na patogenicidade de ENA (KULKARNI et al., 2007; MOT et al., 2014). Neste processo, ferramentas de bioinformática e o uso de plataformas recombinantes em *E. coli* são estratégias que podem favorecer a seleção racional de antígenos e a obtenção de formulações simplificadas e de baixo custo (RODRIGUES et al., 2021).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a imunogenicidade de antígenos recombinantes purificados para o desenvolvimento de uma potencial vacina recombinante contra a enterite necrótica aviária causada por *Clostridium perfringens* G.

## 2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), localizado no Campus Capão do Leão, seguindo as normas regulamentadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e recebeu parecer favorável a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPEL sob número de registro: 040813/2021-23.

Quatro antígenos (A1-A4) de *C. perfringens* associados a ENA foram previamente selecionados a partir da revisão de literatura, caracterizados *in silico*. As sequências de DNA codificantes (CDS) foram sintetizadas (Epoch, Life Science), clonadas e expressas em vetor pET28a, conforme descrito por Rodrigues et al., (2021). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose, utilizando o sistema automatizado de cromatografia líquida ÄKTAprime® (GE Healthcare). A pureza e integridade dos antígenos recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%. A quantificação foi realizada usando o ensaio BCA™ Protein Assay (Pierce).

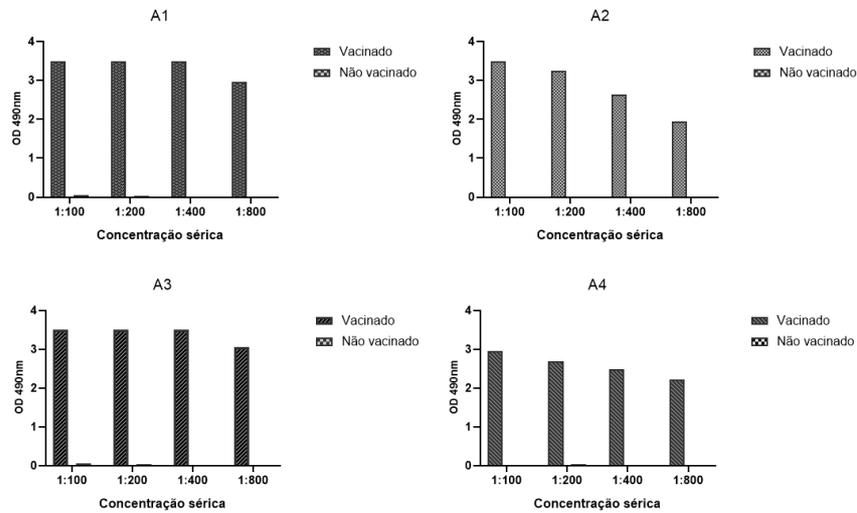
Os antígenos foram caracterizados de forma individual através da produção de soro hiperimune em camundongos. As formulações vacinais foram formuladas contendo 50 ug de cada antígeno, tampão PBS estéril e emulsificadas em adjuvante 50% de Freund's completo (primeira dose) e incompleto (demais doses) (*overnight* a 4°C), totalizando um volume de 0,5 mL por dose.

Na experimentação animal, vinte e cinco camundongos Balb/C (machos, 4-6 semanas de vida) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (G1-G5) contendo cinco animais cada (n=5). Os grupos G1-G4 foram utilizados para avaliar cada um dos antígenos e o G5 como grupo controle, enquanto os demais (G1-G4) foram destinados para cada um dos quatro antígenos a serem avaliados. A vacinação foi realizada por via intraperitoneal, totalizando quatro aplicações para cada antígeno com intervalo de sete dias entre as doses. Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o experimento.

Após sete dias da última inoculação, os animais foram submetidos a sedação para coleta de sangue por punção cardíaca e posteriormente foram eutanasiados. As amostras de sangue foram centrifugadas (3.000 g, 15 min) e o soro resultante utilizado para titulação de anticorpos específicos através do método indireto ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Em geral, para padronização do teste, foram testadas diferentes concentrações de proteína (50ng, 100ng, 200ng e 400 ng) e avaliou-se o *pool* dos soros dos animais vacinados e não vacinados nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. O anticorpo secundário (IgG totais) anti-mouse conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) foi adicionado na diluição de 1:4000. Por fim, a leitura das absorbâncias foi realizada em um leitor de ELISA com leitura a 490 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.)

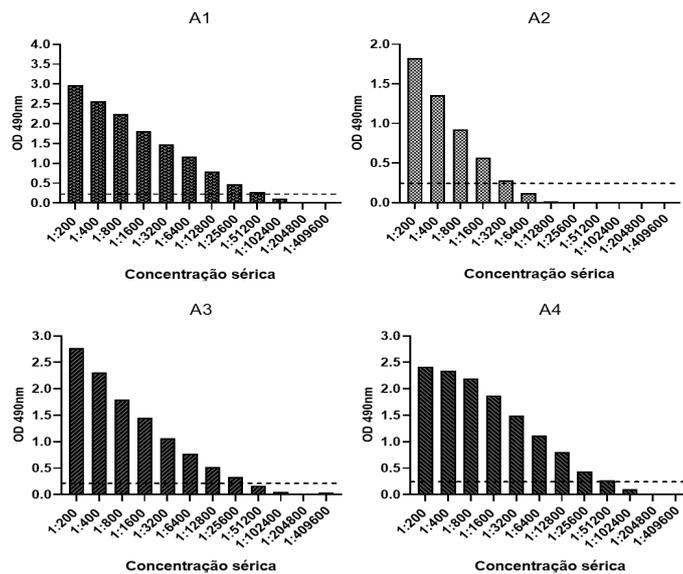
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenho experimental deste estudo incluiu a imunização de camundongos com quatro diferentes antígenos contra ENA, a fim de avaliar o nível de resposta imunológica induzida. Todos os antígenos recombinantes demonstraram gerar uma resposta imune robusta quanto a níveis séricos de anticorpos em camundongos inoculados. Em relação ao grupo não vacinado, os grupos imunizados com 50 ug dos antígenos obtiveram produção significativa de anticorpos IgG, observados em diferentes diluições séricas (Figura 1).



**Figura 1:** Desempenho do ELISA indireto para detecção de IgG anti-A1-A4. Os soros positivos foram feitos a partir do *pool* de camundongos vacinados com antígenos recombinante e os soros negativos a partir do *pool* de camundongos não vacinados. Os resultados são apresentados utilizando a melhor diluição de cada antígeno (A1-A4: 50 ng) em quatro distintas concentrações séricas: 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.

Ao realizar a titulação dos níveis de anticorpos (Figura 2), observou-se que a vacinação com os antígenos 1 e 3 resultou em uma maior produção de IgG em comparação com os demais. Isso foi evidenciado pelo fato de que, para esses antígenos, mesmo com uma alta diluição (1:51200) de soro ainda foi observado uma absorvância que excedeu o limite pré-definido de corte (>0,2), baseado na média das reações dos soros não reativos. Os resultados obtidos em camundongos demonstram que os antígenos investigados são promissores candidatos a imunizantes contra a ENA. No entanto, é essencial realizar avaliações dos níveis de imunoglobulinas nas aves, que constituem a espécie-alvo.



**Figura 2:** Avaliação dos soros de camundongos para titulação de IgG anti-A1-A4. As linhas tracejadas representam a absorvância de 0,2 do ponto de corte para estabelecimento da titulação dos níveis de anticorpos reativos

Estudos anteriores investigaram o papel dos antígenos na indução da antigenicidade e imunogenicidade em frangos de corte (KULKARNI et al., 2007; JIANG et al., 2009; KULKARNI et al., 2010) Os genes responsáveis pela codificação de proteínas cruciais foram clonados e purificados como proteínas recombinantes em *E. coli*, com intuito de gerar níveis elevados de anticorpos nos animais. No entanto, essas pesquisas estão limitadas à proteção parcial e altos custos envolvendo as plataformas de produção dessas vacinas, dificultando a comercialização desses insumos no setor avícola. Além disso, esses resultados podem estar relacionados à incapacidade dessas vacinas em fornecer uma resposta imunoprotetora adequada contra a diversidade de antígenos envolvidos na patogênese de ENA. Além dos antígenos previamente investigados nesse estudo, novas formulações antigênicas serão examinadas com o objetivo de avançar no desenvolvimento de uma vacina segura, com ampla proteção e de baixo custo.

#### 4. CONCLUSÕES

Durante o experimento foi possível produzir soros hiperimunes e avaliar a imunogenicidade de quatro antígenos recombinantes promissores a protótipos vacinais contra a ENA. Após a execução de todas as etapas do processo, ficou evidente que os antígenos avaliados apresentaram de moderado a alto grau de imunogenicidade. Os resultados observados sugerem que esses antígenos têm o potencial de desencadear uma resposta imunológica robusta, sendo promissores alvos no uso de uma vacina recombinante multivalente contra ENA.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COUNCIL OF EUROPEAN UNION. Council Regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. 2003. Acessado em 21 out. 2023 em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32003R0355>.
- FATHIMA, Shahna et al. Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1958, 2022
- GIL DE LOS SANTOS, João Rodrigo; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo; GIL-TURNES, Carlos. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2076-2082, 2008
- JIANG, Yanfen et al. Immunization of broiler chickens against clostridium perfringens–Induced necrotic enteritis using purified recombinant immunogenic proteins. **Avian Diseases**, v. 53, n. 3, p. 409-415, 2009
- KULKARNI, R. R. et al. Immunization of Broiler Chickens against *Clostridium perfringens* -Induced Necrotic Enteritis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1070–1077, set. 2007.
- KULKARNI, R. R. et al. A live oral recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine expressing Clostridium perfringens antigens confers protection against necrotic enteritis in broiler chickens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 205-214, 2010.
- MARTIN, Michael J.; THOTTATHIL, Sapna E.; NEWMAN, Thomas B. Antibiotics overuse in animal agriculture: a call to action for health care providers. *American journal of public health*, v. 105, n. 12, p. 2409-2410, 2015.
- MOT, Dorien et al. Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian pathology*, v. 43, n. 4, p. 290-300, 2014.
- M'SADEQ, Shawkat A. et al. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Animal Nutrition*, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.
- RODRIGUES, Rafael Rodrigues et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant Clostridium perfringens beta toxin designed by bioinformatics tools. **Anaerobe**, v. 69, p. 102326, 2021.