AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *PAENICLOSTRIDIUM SORDELLII* EM OVINOS

MARTINA ALVES LEAL[1]; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES[2]; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA[3]; CLÓVIS MOREIRA JUNIOR[4]; CRISTIAN HENRIQUE SOTT[5]; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – martinaalves0124@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – cmoreira.biotec@ufpel.edu.br*
[5]*Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@efpel.edu.br*
[6]*Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a pecuária tem desempenhado um papel crucial no fortalecimento da economia global (MALAFAIA et al., 2021). Entretanto, apesar do aumento na criação de animais, a cadeia produtiva enfrenta desafios consideráveis devido à prevalência de doenças graves, como as causadas por bactérias do gênero *Clostridium* (HATHEWAY, 1990; LOBATO et al., 2013).

As espécies deste gênero são caracterizadas como bacilos Gram-positivos, formadores de endósporos e principalmente anaeróbios estritos, encontrados no solo e no trato gastrointestinal de animais (HATHEWAY, 1990; LOBATO et al., 2013). Entre as espécies patogênicas pertencentes a este gênero, o *Paeniclostridium sordellii* (anteriormente conhecido como *Clostridium sordellii*) está associado a doenças graves, tais como choque séptico e gangrena gasosa em diversas espécies animais (NYAOKE et AL., 2020).

A patogenicidade de *P. sordellii* está associada principalmente às toxinas hemorrágica (TcsH) e letal (TcsL) (VIDOR et al., 2015). Essas toxinas desempenham um papel crítico na patogênese pela presença de quatro domínios ativos intracelularmente (GTD - domínio glicosiltransferase; CPD - domínio autoprotease; DTL - domínio de translocação; CTD - domínio de ligação ao receptor) (JUST et al., 2000; JANK E AKTORIES, 2008).O CTD é formado por uma região de ligação ao receptor e os oligopeptídeos repetitivos agrupados conhecidos como CROPS (GENTH E JUST, 2015).

Estudos que investigam a atividade imunogênica de TcsH e TcsL durante a infecção demonstram que formulações vacinais no formato de toxoides (toxinas inativadas) desempenham um papel essencial na promoção da imunidade (AMIMOTO et al., 2001; THIELE et al., 2013). No entanto, as limitações dessas vacinas são amplamente reconhecidas, incluindo problemas associados a baixa imunogenicidade e etapas laboriosas do cultivo das bactérias anaeróbicas, impulsionando a busca por metodologias alternativas para a imunização (LOBATO et al., 2004; FERREIRA et al., 2016). Vacinas contra *P. sordellii* ainda se tornam ineficientes em fornecer proteção contra cepas produtoras de TcsH (THIELE et al., 2013).

Atualmente, as abordagens mais atrativas comercialmente para o desenvolvimento de vacinas se baseiam em antígenos recombinantes de alta imunogenicidade, incorporando os domínios imunoprotetores das toxinas (FERREIRA et al., 2016). Proteínas recombinantes atóxicas podem ser fusionadas, permitindo a redução do número de bioprocessos e dos custos do

imunizante (RODRIGUES et al., 2021). Além disso, o emprego de cepas não patogênicas de *Escherichia coli* garante um controle preciso das condições de expressão, tornando o processo de produção mais seguro, previsível e rentável (FERREIRA et al., 2016).Neste contexto, o presente estudo concentra seus esforços no desenvolvimento de formulações vacinais recombinantes em *E. coli* que englobam regiões imunorelevantes de TcsH e TcsL de *P. sordellii*, com o objetivo de avaliar sua imunogenicidade em ovinos.

2. METODOLOGIA

A clonagem e expressão dos clones recombinantes de TcsH e TcsL foram conduzidas utilizando o vetor pET28a, seguindo o método descrito por Moreira et al. (2016). Inicialmente, procedeu-se à construção de dois fragmentos recombinantes, rTcsH e rTcsL, que posteriormente foram fusionados para obtenção do antígeno quimérico, rQTcsHL. Brevemente, para a expressão em *E.coli* BL21 (DE3) os vetores recombinantes foram transformados usando o método de eletroporação. As células foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 100 µg/mL de canamicina. A indução da expressão ocorreu quando a densidade celular atingiu DO_{600} = 0,6-0,8, mediante a adição de 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) à cultura. Para avaliar a solubilidade das proteínas, os sedimentos celulares foram lisados usando lisozima (100 mM) e sonicação (7 ciclos de 15s, amplitude 40), seguido pela purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose, utilizando o sistema automatizado ÄKTAprime® da GE Healthcare. A quantificação das proteínas foi realizada através do método BCA™ ProteinAssay (Pierce) e a análise foi conduzida no software TotalLabquant®. O rendimento e a estabilidade foram avaliados por meio de SDS-PAGE 12%.

O antígeno rQTcsHL foi usado para geração da formulação vacinal avaliada em ovinos (vacina purificada). Nesta etapa, o antígeno purificado foi adsorvido em 15% de adjuvante hidróxido de alumínio (16 h a 4 °C). Ovinos sem raça definida (SRD) machos e fêmeas foram vacinados com duas doses de cada antígeno, nos dias 0 e 30 (n=21; 200 µg por dose). Todos os animais foram vacinados por via subcutânea e o sangue (10 mL) coletado por punção da veia jugular utilizando-se tubos do tipo Vacuplast®. Após, os soros foram obtidos por centrifugação (3000 × g, 7 min).

Os níveis de anticorpos séricos foram analisados por ELISA indireto (do inglês “*EnzymeLinkedImmunonoSorbentAssay*). Para isso, placas Nunc-Immuno de 96 poços foram revestidas com 200 ng de rTcsL, rTcsH ou rQTcsHL por cavidade.As proteínas foram previamente diluídas em tampão de sensibilização (100 µL por poço com carbonato-bicarbonato 0,2 M - pH 9,7) e as placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C.

Após a incubação, as placas foram bloqueadas com leite em pó (100 µL/poço; 5% w/vem PBS-T) por 1 h a 37°C. Posteriormente, os poços receberam 100 µL dos soros de ovinos diluídos em PBS-T contendo 2,5% de leite em pó, sendo incubados por 1 h a 37°C. Procedendo à incubação, o anticorpo secundário anti-ovino IgG conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) foi adicionado na diluição de 1:5000 em PBS-T(1 hora a 37°C). Para remoção do excesso de cada produto não ligante, lavagens com PBS-T foram realizadas intercalando cada etapa de incubação (5x).

Por fim, realizou-se a incubação por 15 minutos à temperatura ambiente com a solução cromogênica de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD). A leitura

das absorbâncias foi realizada em um leitor de ELISA com leitura a 490 nm, e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA).

Os dados sorológicos estão apresentados como a média das duplicatas das amostras. Teste one-way ANOVA foi utilizado para avaliar o esquema vacinal, considerando os valores significativos representados como $p < 0,05$, $^{**}p < 0,001$ e $^{**}p < 0,0001$. Todos os gráficos e análises estatísticas utilizaram o software Graph Pad Prism 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da vacinação com o antígeno quimérico rQTcsHL contra TcsH e TcsL em ovinos, os resultados demonstraram que a formulação vacinal induziu altos níveis de anticorpos da classe IgG. Em termos estatísticos, a formulação vacinal rQTcsHL foi eficaz em induzir níveis elevados de anticorpos anti-rTcsH, anti-rTcsL e anti-rQTcsHL. Níveis superiores de imunoglobulinas foram evidentes após a administração de uma (dia 30) e duas doses (dia 60) em comparação com os animais não imunizados.

Até o momento, não foram desenvolvidas vacinas recombinantes direcionadas a *P. sordellii*. No entanto, estudos recentes têm demonstrado resultados promissores em termos de imunogenicidade em modelos animais e animais de campo em relação às toxinas que compartilham alta semelhança com TcsH e TcsL. Especificamente, o domínio CROPs das toxinas A (TcdA) e B (TcdB) de *Clostridioides difficile*, que são proteínas análogas a TcsH e TcsL, demonstrou capacidade imunogênica em estudos de vacinação (JANK E AKTORIES, 2008; ZHANG et al., 2016). No âmbito deste estudo, uma construção antigênica bivalente (rQTcsHL) baseada nesta região foi eficaz na indução de imunidade e na promoção do efeito de reforço em ovinos imunizados. Esses resultados estão em concordância com estudos que validaram imunizantes recombinantes quiméricos contra TcdA e TcdB (ZHANG et al. 2016 E WANG et al. 2018).Portanto, esse conhecimento abre perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias imunoprofiláticas contra *P. sordellii* em rebanhos.

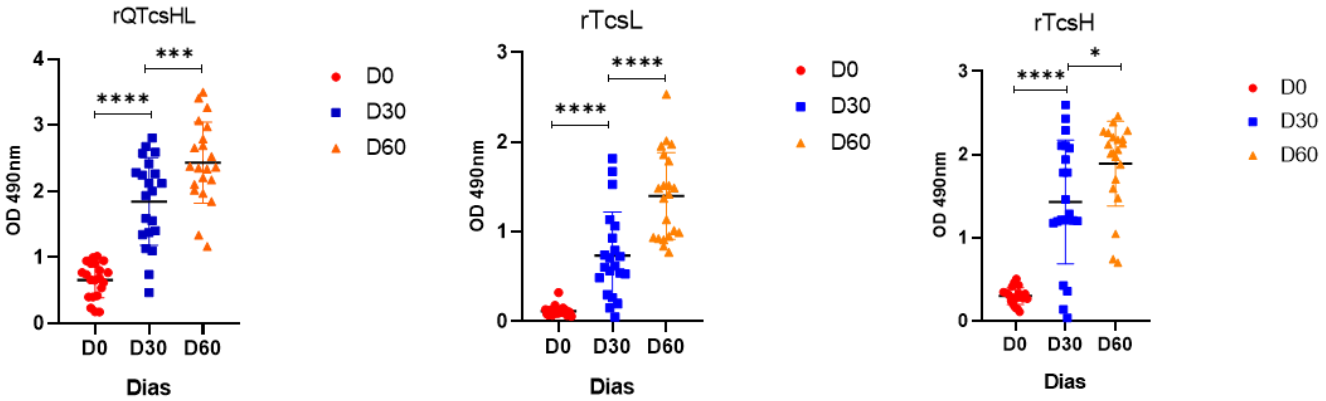

Figura 1:Níveis de imunoglobulinas séricas totais anti-rTcsL, anti-rTcsH e anti-rQTcsHL determinados por ELISA indireto nas ovelhas vacinadas com vacina purificada de rQTcsHL, no dia 0 (pré-vacinação), 30 e 60 pós-vacinação ($^{*}p < 0,05$; $^{***}p < 0,001$; $^{****}p < 0,0001$).

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, os resultados indicam que o antígeno bivalente rQTcsHL mostra potencial como protótipo vacinal para futuros testes visando o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra as principais toxinas de *P. sordellii*. Este estudo representa uma plataforma promissora para a produção de vacinas bivalentes através de um único processo biotecnológico, proporcionando uma abordagem segura, econômica e imunogênica contra o *P. sordellii.*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MALAFAIA, G. C. et al. The Brazilian beef cattle supply chain in the next decades. Livestock science, v. 253, n. 104704, p. 104704, 2021.'

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. Clinical microbiology reviews, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.

LOBATO, F. C. F. et al. Clostridioses dos animais de produção. Veterinária e Zootecnia, v. 20, p. 29-48, 2013

NYAOKE, A. C. et al. *Paeniclostridium (Clostridium) sordellii*-associated enterocolitis in 7 horses. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, v. 32, n. 2, p. 239–245, 2020.

VIDOR, C.; AWAD, M.; LYRAS, D. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sordellii*. Research in Microbiology, v. 166, n. 4, p. 368-374, 2015

JUST, I.; HOFMANN, F.; AKTORIES, K. Molecular mechanisms of action of the large Clostridial cytotoxins. In: Bacterial Protein Toxins. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 307-331.

JANK, T.; AKTORIES, K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends in microbiology, v. 16, n. 5, p. 222-229, 2008

GENTH, Ha.; JUST, I.. Large clostridial glycosylating toxins modifying small GTPases. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, p. 441, 2015

AMIMOTO, K. et al. Protective effects of *Clostridium sordellii* LT and HT toxoids against challenge with spores in guinea pigs. Journal of Veterinary Medical Science, v. 63, n. 8, p. 879-883, 2001

FERREIRA, M. R. A. et al. Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines. Toxins, v. 8, n. 11, p. 340, 2016.

THIELE, Teri L.; STUBER, Tod P.; HAUER, Paul J. Detection of *Clostridium sordellii* strains expressing hemorrhagic toxin (TcsH) and implications for diagnostics and regulation of veterinary vaccines. Vaccine, v. 31, n. 44, p. 5082-5087, 2013.

RODRIGUES, R. R. et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. Anaerobe, v. 69, n. 102326, p. 102326, 2021.

MOREIRA, G. M. S. G. et al. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. Scientific reports, v. 6, n. 1, p. 22816, 2016. MOREIRA, G. M. S. G. et

ZHANG, B.-Z. et al. A DNA vaccine targeting TcdA and TcdB induces protective immunity against *Clostridium difficile*. BMC infectious diseases, v. 16, n. 1, 2016.

WANG, S. et al. Novel chimeric protein vaccines against *Clostridium difficile* infection. Frontiers in immunology, v. 9, p. 2440, 2018.