

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Carolina Pantuzza Ramos

**AVALIAÇÃO DE IMUNOGENICIDADE DE FORMULADOS VACINAIS  
RECOMBINANTES CONTRA *Clostridioides difficile***

Belo Horizonte

2023

**Carolina Pantuzza Ramos**

**AVALIAÇÃO DE IMUNOGENICIDADE DE FORMULADOS  
VACINAIS RECOMBINANTES CONTRA  
*Clostridioides difficile***

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de  
grau de Doutora em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientadores: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dr. João Luis Reis Cunha

**BELO HORIZONTE**

**2023**

R175a Ramos, Carolina Pantuzza ,1992-  
Avaliação de imunogenicidade de formulados vacinais recombinantes  
contra *Clostridioides difficile* /Carolina Pantuzza Ramos. – 2023.  
106f

Orientador: Otávio Silveira  
Coorientadores: Ricardo Toshio Fujiwara  
João Luís Reis Cunha

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da  
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.  
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva  
Inclui Bibliografia

1. Clostridioses - Teses - 2. Clostridium difficile - Teses –  
3. Diarreia em animais - Teses - I. Silveira, Otávio - II. Fujiwara, Ricardo  
Toshio - III. Cunha, João Luís Reis – IV. Universidade Federal de Minas  
Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA PANTUZZA RAMOS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 31 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Rodrigo Otávio Silveira Silva - Orientador  
Dr.(a). Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Dr.(a). Eliane Oliveira Ferreira  
Dr.(a). Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes  
Dr.(a). Sílvia Figueiredo Costa



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otávio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 31/05/2023, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Maurício Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2023, às 20:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane de Oliveira Ferreira, Usuária Externa**, em 01/06/2023, às 21:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Figueiredo Costa, Usuário Externo**, em 13/07/2023, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2303986** e o código CRC **CD48F9B8**.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo Bruno. Seu companheirismo, cuidado e paciência foram fundamentais para o fechamento desse ciclo.

Aos meus pais, sempre confiantes em meus passos e por me proporcionarem todo o suporte necessário para minha caminhada até aqui.

Aos meus amigos. Posso me considerar uma pessoa de sorte por ter pessoas tão queridas por perto.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, equipe do Laboratório de Anaeróbios, professor Francisco Lobato e Rodrigo Silva, agradeço a oportunidade e parceria.

A equipe do LIGP, em especial professor Ricardo Fujiwara, professor João Cunha, Williane e Laila. Sou muito grata por todo auxílio, ensinamentos e parceria!

Ao professor Roberto Guedes e equipe, cujo auxílio foi também fundamental para a realização deste estudo. Também sou imensamente grata ao Douglas e Willian, técnicos da Fazenda Experimental em Igarapé e que foram essenciais para a execução dos ensaios nos animais.

À Universidade de Saskatchewan e equipe do CostaLab, em especial professor Matheus Costa. Sou imensamente grata por me abrirem as portas e por serem tão acolhedores. Os ensinamentos e convívio foram marcantes.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, onde tive minha primeira experiência como pesquisadora e tanto aprendi. Sou imensamente grata!

Às instituições de apoio e fomento a pesquisa, CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPq, por possibilitarem a realização dos experimentos.

Por ter aceito o convite de avaliação do presente trabalho, agradeço imensamente à banca examinadora.

Enfim, pela lei natural dos encontros, a todos que passaram por mim e em que deixei e também recebi um tanto.

*Temos duas vidas.  
A segunda começa  
quando percebemos  
que só temos uma.*

Confúcio

## RESUMO

A infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) é de grande relevância em suínos neonatos, dado principalmente às perdas produtivas e manifestações clínicas associadas às lesões colônicas causadas pelos principais fatores de virulência do patógeno, as exotoxinas A (TcdA) e B (TcdB). A necessária aplicação de métodos de controle e prevenção de *C. difficile* e/ou seus fatores de virulência é potencializada pelo caráter zoonótico do agente, sendo os casos comunitários da infecção considerados emergentes e em ascensão. O agente, que se encontra disseminado em diversos países, incluindo o Brasil, possui o seu controle dependente principalmente de medidas sanitárias e, atualmente, de uma vacina baseada em toxoides A e B, cujos dados de eficácia em granjas positivas ainda são desconhecidos. Contudo, métodos imunoproliféricos compostos por proteínas recombinantes, tecnologia sabidamente vantajosa para a produção industrial, ainda não existem. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de duas vacinas recombinantes a partir de fragmentos imunogênicos das toxinas A e B de *C. difficile* para a prevenção da infecção em leitões. A seleção dos fragmentos antigênicos para elaboração das vacinas, formados pela porção C-terminal das toxinas A e B, contou com ensaios *in silico* para a avaliação da possível presença de epítomos para células B, bem como otimização dos códons para expressão em *E. coli*. Dada a montagem do vetor plasmidial sintético, clonagem em *E. coli* e expressão das proteínas, o estudo seguiu com a realização de testes de esterilidade, inocuidade e potência em hamsters. Ainda, foi realizada a imunização de coelhos em três doses e utilizando-se duas diferentes massas antigênicas de ambas as vacinas, seguido da realização de ensaios na espécie alvo, para análise e quantificação da produção de IgG anti-TcdA e anti-TcdB por ELISA. Foram sintetizadas duas vacinas: bivalente (AB), composta por fragmentos recombinantes de TcdA e de TcdB; e quimera (Q), correspondente à síntese dos mesmos fragmentos em uma única proteína. As vacinas recombinantes sintetizadas apresentaram-se estéreis e inócuas, apesar de não terem protegido os hamsters sírios, altamente susceptíveis à infecção, após o seu desafio. Títulos de

anticorpos anti-TcdA e TcdB foram observadas a partir da primeira imunização dos coelhos com as vacinas AB e Q. O platô da reatividade entre os anticorpos presentes no soro dos animais e os antígenos foi atingido com a realização de duas doses, sendo desnecessária a aplicação de uma terceira dose ( $p \leq 0,05$ ). Ainda, não foi observado diferenças significativas entre as massas antigênicas presentes nas vacinas (10 e 50  $\mu\text{g}$ ), tampouco foi observada diferença entre as vacinas Q e AB em coelhos ( $p \geq 0,05$ ). Similarmente ao observado em coelhos, a presença de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB foi observada nas porcas imunizadas com a primeira dose de ambas as vacinas AB e Q (20  $\mu\text{g}$  cada). A colostragem dos leitões neonatos por porcas vacinadas resultou em aquisição de imunidade passiva anti-TcdA e anti-TcdB pelos animais, em contraste com os leitões controle ( $p \leq 0,05$ ). A imunização de porcas com a vacina Q conferiu títulos de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB superiores aos títulos induzidos pela vacina AB no soro dos leitões, sugerindo a superioridade deste composto como imunógeno contra as toxinas A e B de *C. difficile*. Em conclusão, o presente estudo mostrou que as proteínas recombinantes sintetizadas foram capazes de induzir títulos de anticorpos contra as proteínas A e B de *C. difficile* em matrizes suínas, sendo passivamente transferidos aos leitões colostrados que possivelmente tornaram-se protegidos contra a infecção por *C. difficile*.

Palavras-chave: ICD; diarreia neonatal suína; resposta imune; zoonose



## ABSTRACT

*Clostridioides difficile* (CDI) infection is of great relevance in newborn piglets, mainly due to production losses and clinical disease associated with colonic lesions caused by the main virulence factors of the pathogen, the exotoxins A (TcdA) and B (TcdB). The application of control and prevention methods for *C. difficile* and/or its virulence factors is enhanced by the zoonotic nature of the agent, with the community cases considered emergent and enhancing. The agent is widespread in several countries, including Brazil, and has its control dependent mainly on sanitary measures and, currently, on a vaccine based on toxoids A and B, whose efficacy data on *C. difficile* positive farms are still unknown. However, immunoprophylactic methods composed of recombinant proteins, known to be advantageous for industrial production, do not exist yet. Thus, the present study aimed to develop two recombinant vaccines from immunogenic fragments of *C. difficile* toxins A and B to prevent infection in piglets. The selection of antigenic fragments for the preparation of vaccines, formed by the C-terminal portion of toxins A and B, relied on in silico assays to evaluate the possible presence of epitopes for B cells, as well as optimization of codons for expression in *E. coli*. Given the assembly of the synthetic plasmid vector, cloning in *E. coli* and protein expression, the study continued with sterility, harmlessness and potency tests in hamsters. Also, rabbits were immunized in three doses using two different antigenic masses of both vaccines, followed by tests on the target species, for analysis and quantification of anti-TcdA and anti-TcdB IgG production by ELISA. Two vaccines were produced: bivalent (AB), consisting of recombinant fragments of TcdA and TcdB; and chimera (Q), corresponding to the synthesis of the same fragments in a single protein. The synthesized recombinant vaccines were sterile and innocuous, despite not having protected Syrian hamsters, highly susceptible to infection, after their challenge.

Anti-TcdA and TcdB antibody titers were observed after the first immunization of the rabbits with AB and Q vaccines. The plateau of the reactivity between the antibodies present in the serum of the animals and the antigens was reached with the administration of two doses, being unnecessary the application of a third dose ( $p \leq 0.05$ ). Furthermore, no significant differences were observed between the different antigenic quantity between the vaccines (10 or 50  $\mu\text{g}$ ), nor was there any lack of difference between the Q and AB vaccines ( $p \geq 0.05$ ). Similar to what was observed in rabbits, the presence of anti-TcdA and anti-TcdB antibodies was seen in sows immunized with the first dose of both AB and Q vaccines (20  $\mu\text{g}$  each). Colostration of newborn piglets by vaccinated sows resulted in the acquisition of passive anti-TcdA and anti-TcdB immunity by the animals, in contrast to control piglets ( $p \leq 0.05$ ). Immunization of sows with the Q vaccine conferred a higher anti-TcdA and anti-TcdB response by piglets in comparison to the AB vaccine, suggesting the superiority of this compound as an immunogen against *C. difficile* toxins A and B. In conclusion, the present study showed that the synthesized recombinant proteins were capable of inducing antibody titers against *C. difficile* proteins A and B in sows, being passively transferred to piglets by the colostrum that possibly became protected against infection by *C. difficile*.

Keywords: CDI; swine neonatal diarrhea; immune response; zoonosis

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.3.1.** Representação das quatro subdivisões identificadas nas toxinas A (308 kDa) e B (270 kDa) de *C. difficile*.....22
- Figura 3.3.2.** Representação esquemática da cascata de eventos desencadeados pelas toxinas A e B de *C. difficile* a partir de sua internalização pelos enterócitos de hospedeiros susceptíveis à infecção.....22
- Figura 3.3.3.** Espaçamento entre alças intestinais decorrente de intensa edemaciação de mesocólon, achado comumente identificado em suínos neonatos infectados por *C. difficile*.....23
- Figura 4.1.2.1** Principais componentes presentes no vetor plasmideal pet28a-TEV (Novagen, USA).....42
- Figura 4.1.2.2.** Esquematização do processo de digestão do plasmídeo pET28a-TEV e fragmentos de nucleotídeos de TcdA e TcdB por enzimas de restrição.....43
- Figura 4.2.1.1.** Isolador situado no Laboratório de Soros e Vacinas da Escola de Veterinária da UFMG e utilizado para o acondicionamento individual dos animais sensibilizados e desafiados por *C. difficile*.....48
- Figura 4.3.1.1.** Acondicionamento individual e respectivas identificações de coelhos Nova Zelândia submetidos a experimentação, realizada no setor de cunicultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG.....52
- Figura 4.3.2.1.** Representação esquemática da imunização e coleta sanguínea de coelhos da raça Nova Zelândia para avaliação da presença e títulos de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.....54
- Figura 4.3.3.1.** Representação esquemática da imunização e coleta sanguínea de suínos imunizados para detecção e titulação de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.....55

<b>Figura 4.3.3.2.</b> Contenção de matrizes suínas Landrace prenhas submetidas a experimentação, com realização de coleta sanguínea pela veia jugular e imunização via intramuscular. Imagem obtida do setor de suinocultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG.....	56
<b>Figura 4.3.3.3.</b> Coleta sanguínea pela veia jugular de leitão neonato aleatoriamente selecionado, parido de matriz imunizada com as vacinas Q, AB ou controle. Imagem obtida do setor de suinocultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG.....	57
<b>Figura 5.1.1.</b> Apresentação parcial das sequências de aminoácidos das toxinas A (a) e B (b) submetidas a análise de predição de epítomos para linfócitos B no programa Bepipred 2.0 (CBS, DEN). Regiões com maior probabilidade de antigenicidade ( $\geq 0,5$ ) estão marcadas em vermelho.....	60
<b>Figura 5.1.2.</b> Gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos <i>primers</i> T7 <i>forward</i> e T7 <i>reverse</i> de clones de BL21Star selecionados em meio 2xYT com kanamicina.....	63
<b>Figura 5.2.1.</b> a) Western blotting das proteínas recombinantes produzidas por Arctic Express após revelação de anticorpo conjugado anti-Histidina. b) Gel SDS 10% das proteínas produzidas por BL21.....	64
<b>Figura 5.2.2</b> Perfil cromatográfico obtido na purificação das proteínas recombinantes TcdAB (5.2 a) TcdA (5.2 b) e TcdB (5.2 c).....	65
<b>Figura 5.3.1</b> Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de diferentes grupos de hamsters sírios desafiados por <i>C. difficile</i> (RT 014/020) e observados durante 8 dias. ....	68
<b>Figura 5.3.2.</b> Hamster sírio desafiado por <i>C. difficile</i> e eutanasiado. Cavidade abdominal de hamster desafiado por <i>C. difficile</i> .....	69

<b>Figura 5.3.2.1.</b> Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de coelhos imunizados com as vacinas bivalente contendo 10µg (AB1) e 50 µg (AB2) e quimera com 10 e 50 µg (Q1 e Q2, respectivamente) nos tempos 0, 14, 28 e 42 avaliados por ELISA indireto.....	70
<b>Figura 5.3.2.2.</b> Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de coelhos controle e vacinados avaliados por ELISA indireto.....	71
<b>Figura 5.4.1.</b> Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de matrizes suínas controle e imunizadas com as vacinas bivalente (AB) e quimera (Q) avaliados por ELISA indireto.....	73
<b>Figura 5.4.2.</b> Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de leitões controle e imunizados com as vacinas bivalente (AB) e quimera (Q) avaliados por ELISA indireto.....	74
<b>Figura 5.4.3.</b> 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 quimera (Q) avaliados por ELISA indireto.....	75

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.5.1.** Modelo animal e imunógenos compostos por toxoides ou fragmentos das toxinas A e B de *C. difficile* desenvolvidos para a prevenção da ICD em estudos pré-clínicos.....28
- Tabela 3.5.2.** Modelo animal e composição de métodos e/ou imunógenos elaborados para a prevenção da colonização por *C. difficile* em ensaios pré-clínicos.....33
- Tabela 3.5.3.** Composição, finalidade, via de inoculação e referências de estudos de métodos profiláticos ou terapêuticos aplicados em suínos.....36
- Tabela 4.2.2.1.** Grupos de hamsters sírios utilizados para avaliação da potência das vacinas recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.....49
- Tabela 4.3.2.1.** Grupos de coelhos Nova Zelândia utilizados para avaliação da potência das vacinas recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.....53

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1. Histórico do agente.....	20
3.2. Epidemiologia da ICD em suínos.....	21
3.3. Patogenia e sinais clínicos.....	23
3.4. Diagnóstico e tratamento.....	25
3.5. Controle e prevenção.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Construção do inserto, clonagem e produção de proteínas recombinantes contendo fragmentos das toxinas A e B de <i>Clostridioides difficile</i> .....	40
4.1.1. Construção e caracterização do inserto plasmideal.....	40
4.1.2. Transformação bacteriana e clonagem em Arctic Express e BL21.....	41
4.1.3. Expressão, purificação e caracterização das proteínas recombinantes.....	45
4.1.4. Testes de esterilidade e inocuidade em células.....	46
4.2. Imunização de hamsters e análise da potência das proteínas recombinantes em um modelo experimental de infecção por <i>C. difficile</i> .....	46
4.2.1. Local de execução experimento.....	47
4.2.2. Imunização.....	48
4.2.3. Produção dos esporos.....	50
4.2.4. Sensibilização dos hamsters e desafio.....	50

4.3. Imunização de coelhos e suínos e análise da produção de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes por ensaio imunoenzimático.....	51
4.3.1. Local de execução dos experimentos.....	52
4.3.2. Imunização e coleta sanguínea dos coelhos.....	53
4.3.3. Imunização ativa e passiva dos suínos.....	54
4.3.4. Padronização e execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) indireto .....	57
4.4. Análises estatísticas.....	58
5. RESULTADOS.....	60
5.1. Seleção e análises <i>in silico</i> de potenciais alvos vacinais.....	60
5.2. Produção e caracterização das vacinas recombinantes.....	63
5.3. Testes pré-clínicos.....	66
5.3.1 Análise de potência em hamster sírio.....	66
5.3.2. Análise de resposta imune humoral em coelhos Nova Zelândia.....	68
5.4. Testes clínicos em suínos e análise da imunização passiva.....	71
6. DISCUSSÃO.....	76
7. CONCLUSÕES.....	86
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
10. ANEXOS.....	103
10.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG.....	103



## 1. INTRODUÇÃO

*Clostridioides difficile* é um anaeróbio estrito e formador de esporos com alta resistência e capacidade de disseminação pelo ambiente. A infecção por *C. difficile* (ICD) é considerada uma das principais causas de colite pseudomembranosa em seres humanos, inicialmente caracterizada pelo acometimento de pacientes hospitalizados. Dados recentes tem demonstrado, entretanto, o aumento vertiginoso da infecção pelo agente não relacionado ao ambiente hospitalar, os chamados casos comunitários da ICD. Os casos comunitários da infecção por *C. difficile* possivelmente estão atrelados, dentre outros fatores, ao contato com animais infectados. Nesse sentido, é reconhecida a grande incidência de infecções em seres humanos no ambiente comunitário por estirpes comumente identificadas em animais, incluindo suínos, como as de ribotipo RT078, RT126 e RT014/020.

Além do potencial zoonótico do agente, *C. difficile* é também considerado um importante agente etiológico da diarreia neonatal suína e está associado principalmente à redução no ganho de peso dos animais. Colite e edema de mesocólon são frequentemente detectadas em suínos infectados, em consequência das lesões provocadas pelos principais fatores de virulência do agente, as toxinas A e B. No Brasil, trabalhos sugerem que a infecção por *C. difficile* encontra-se disseminada entre os plantéis, com frequência de ocorrência de até 53,3%.

Dada a microbiota ainda em formação, importante fator de risco para a infecção por *C. difficile*, os leitões infectam-se nos primeiros dias de vida, após a ingestão de esporos presentes no ambiente e/ou eliminados pelas matrizes carreadoras do agente. Por ser um microrganismo formador de esporos que pode se disseminar e perpetuar no ambiente por longos períodos, a prevenção da infecção por *C. difficile* deve ocorrer, idealmente,

por métodos imunoproláticos, havendo atualmente uma vacina comercial composta por toxoides Suiseng® Diff/A (Hipra, ESP). Estudos anteriores demonstraram que a administração parenteral de imunoglobulinas anti-TcdA e anti-TcdB neutralizantes em leitões gnotobióticos, desafiados por *C. difficile*, foi capaz de reduzir a ocorrência de sinais clínicos severos e até a sua mortalidade. Ainda, estudos demonstraram uma elevada imunogenicidade dos fragmentos C-terminal das toxinas A e B, denominados *combined repetitive oligopeptide* (CROP) ou *receptor binding domain* (RBD), responsáveis pela ligação das toxinas a receptores presentes no epitélio intestinal. Nesse sentido, ensaios conduzidos com a imunização de animais a partir destes fragmentos resultaram em potente resposta protetora frente ao desafio pelo agente toxigênico.

Apesar da existência de dados relacionados à imunogenicidade e proteção conferida pela imunização utilizando-se fragmentos situados na região C-terminal das toxinas, não existem métodos imunoproláticos, compostos pela tecnologia do DNA recombinante, para a prevenção da doença em leitões. Os métodos atualmente disponíveis no Brasil são compostos, principalmente, por medidas sanitárias relacionadas à higienização do ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 1           2.1. Geral

Desenvolver vacinas recombinantes a partir de fragmentos imunogênicos das toxinas A e B de *Clostridioides difficile* para a prevenção da infecção por *C. difficile* (ICD) em leitões.

### 2           2.2. Específicos

- I. Selecionar e caracterizar sequências imunogênicas contidas nas toxinas A e B de *C. difficile*.
- II. Gerar clones de *E. coli* contendo plasmídeos codificadores de fragmentos imunogênicos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.
- III. Expressar e produzir uma vacina recombinante bivalente e uma vacina recombinante quimérica.
- IV. Imunizar hamsters com as diferentes vacinas recombinantes e avaliar a sua potência por indução da infecção por *C. difficile* em um modelo experimental.
- V. Imunizar coelhos com as diferentes vacinas recombinantes e avaliar o potencial de produção de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes.
- VI. Imunizar matrizes suínas gestantes com as diferentes vacinas recombinantes e avaliar a sua imunidade ativa e transferência passiva de anticorpos anti-TcdA e TcdB em leitões neonatos colostrados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1           3.1. Histórico do agente

*Clostridioides difficile* é um bastonete gram-positivo, anaeróbio estrito e formador de esporos com alta capacidade de disseminação e resistência ao ambiente (CZEPIEL et al., 2019). Descrito em 1935, *C. difficile* foi inicialmente reconhecido como componente natural da microbiota intestinal de seres humanos neonatos (HALL; O'TOOLE, 1935). Posteriormente, ao final da década de 1970, o agente foi associado à ocorrência de colite e diarreia nestes hospedeiros em um quadro reconhecido como *C. difficile* associado a diarreia (CDAD), sendo atribuído principalmente à maior susceptibilidade dos indivíduos hospitalizados (BARTLETT et al., 1978; LYERLY; KRIVAN; WILKINS, 1988).

A infecção por *C. difficile* (ICD) é considerada uma das principais causas de colite pseudomembranosa em seres humanos e responsável por até 33% das ocorrências de diarreia associada ao uso de antibióticos (BARTLETT, 2002; CANÇADO et al., 2018). Destaca-se o crescimento vertiginoso da diarreia de origem nosocomial provocada pelo agente em diversos países a partir do início do século XXI, com aproximadamente um milhão de casos e quase 30 mil mortes anuais provocadas por quadros graves da ICD apenas nos Estados Unidos (AUGUSTYN et al., 2022; CDC, 2019; DEPESTEL; ARONOFF, 2013; GUH et al., 2020; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019). Ressalta-se, ainda, os custos associados à doença em unidades de saúde dos EUA, estimados em aproximadamente 6 bilhões de dólares anuais (ZHANG et al., 2016).

No Brasil, foi demonstrada a ocorrência do agente em até 31% dos casos investigados de diarreia nosocomial (CANÇADO et al., 2018). Em seu ciclo

nosocomial, a incidência da ICD em seres humanos apresentou taxas ascendentes até meados da segunda década de 2000 (DEPESTEL; ARONOFF, 2013), momento em que os casos comunitários da infecção passaram a ser descritos com maior frequência (CDC, 2019; DEPESTEL; ARONOFF, 2013).

A incidência crescente da ICD em seus diferentes ciclos é associada ao surgimento de estirpes denominadas hipervirulentas ou epidêmicas, que dentre suas principais características, apresentam reduzida susceptibilidade a antimicrobianos e são responsáveis por quadros clínicos mais graves da doença (DEPESTEL; ARONOFF, 2013; FREEMAN et al., 2010). Nesse aspecto, a utilização de antimicrobianos em pacientes hospitalizados e o seu uso como promotor de crescimento na produção animal foram determinantes para o surgimento destas estirpes (DEPESTEL; ARONOFF, 2013; DINGLE et al., 2019; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019). São exemplos os ribotipos hipervirulentos RT027, uma estirpe fluoroquinolona-resistente que emergiu na América do Norte (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019) e RT078, que comumente apresenta mecanismos de resistência às tetraciclinas, droga amplamente utilizada na suinocultura (DINGLE et al., 2019).

Além do surgimento das estirpes hipervirulentas, que é considerado um importante fator para a disseminação da ICD, estudos sugerem, ainda, que a transmissão de *C. difficile* em seu ciclo comunitário é favorecida por outros elementos, sendo portanto de origem multifatorial (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; OTTEN et al., 2010). Tal hipótese é levantada em função do crescente aumento da incidência de casos comunitários adicionalmente à considerável detecção das variáveis estirpes associadas (e não somente hipervirulentas) em diferentes ambientes e hospedeiros (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; OTTEN et al., 2010; XU et al., 2014). São exemplos a detecção do agente em produtos de origem animal destinados ao consumo humano (RODRIGUEZ-PALACIOS et al.,

2013; WEESE et al., 2009), no solo (KNIGHT; RILEY, 2019; OTTEN et al., 2010; USUI et al., 2017), efluentes (ROMANO et al., 2012; XU et al., 2014) e em fezes de animais silvestres e domésticos (KEEL et al., 2007; KRIJGER et al., 2019; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; WEESE, 2020a; WEESE et al., 2010), sugerindo, ainda, o potencial zoonótico do agente (KNIGHT; RILEY, 2019; RODRIGUEZ et al., 2016).

A possível atuação de animais domésticos e silvestres como reservatórios do agente a seres humanos é reforçada pela similaridade genética entre os diferentes hospedeiros (KNETSCH et al., 2014, 2018; KNIGHT et al., 2017; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019). Nesse sentido, destaca-se a frequente detecção do ribotipo hipervirulento RT078 e os ribotipos endêmicos RT014 e RT001, importantes causadores do ciclo comunitário da ICD, em animais domésticos, o que inclui os suínos (GOORHUIS et al., 2008; HENSGENS et al., 2012; RUPNIK et al., 2008). Ainda, estudos apontaram similaridade genética e fenotípica entre isolados de animais sintomáticos e/ou assintomáticos e estirpes isoladas de seres humanos infectados, evidenciando a transmissão interespecie de *C. difficile* (BJÖERSDORFF et al., 2021; KNETSCH et al., 2014; KNIGHT et al., 2017; WEESE, 2020a).

### 1                    **3.2. Epidemiologia da ICD em suínos**

Além de sua atuação como um agente zoonótico, *C. difficile* possui destaque, ainda, como etiologia de colite e diarreia em animais (KEEL; SONGER, 2006; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012). Estudos relatam a ocorrência da enfermidade em animais domésticos a partir de 1980 (JONES; HUNTER, 1983), sendo posteriormente constatado o seu importante papel na diarreia neonatal em suínos, que são altamente susceptíveis à infecção pelo agente em seus primeiros dias de vida (KEEL; SONGER, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019b; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012).

*C. difficile* foi primeiramente descrito em suínos no ano de 1983, sendo isolado em conteúdo intestinal e fezes destes animais (JONES; HUNTER, 1983). A posterior associação do agente à infecção por *C. difficile* (ICD) foi relacionada principalmente ao desencadeamento de colite, edema de mesocólon e diarreia (WATERS et al., 1998; YAEGER; KINYON; SONGER, 2007).

A ICD é uma afecção de ocorrência mundial, com prevalências que variam de 18 a 84% em animais de 1 a 7 dias de idade em leitões (ALVAREZ-PEREZ et al., 2009; LIPPKE et al., 2011; SONGER; ANDERSON, 2006; WEESE, 2020b; YAEGER; FUNK; HOFFMAN, 2002; YAEGER; KINYON; SONGER, 2007). No Brasil, estudos demonstraram frequência de ocorrência em até 53% das granjas analisadas, apontando a disseminação do agente no país (LIPPKE et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Dos ribotipos de *C. difficile* identificados com maior frequência em suínos destaca-se o ribotipo hipervirulento RT078 (ANDRÉS-LASHERAS et al., 2017; KIM et al., 2018; KRUTOVA et al., 2018; WEESE, 2020a). Com menor predominância, são detectados uma ampla variedade de outros ribotipos, também associados à ocorrência da infecções nos animais em diversos países, como o RT014/020, RT126, RT066 e RT012 (ALVAREZ-PEREZ et al., 2009; ANDRÉS-LASHERAS et al., 2017; KEEL et al., 2007; KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2015; SILVA et al., 2015; WEESE, 2020a). No Brasil, foi detectado a ocorrência dos ribotipos RT001/072, RT012, RT126 e principalmente o ribotipo RT014/020 (SILVA et al., 2015), previamente apontado como mundialmente distribuído e associado à doença em animais e seres humanos (HENSGENS et al., 2012; JANEZIC et al., 2012, 2014).

### 1 3.3. Patogenia e sinais clínicos

A ICD em suínos ocorre predominantemente em leitões de 1 a 7 dias de idade (PROCTOR et al., 2021; SONGER; ANDERSON, 2006; SONGER; UZAL, 2005), cuja susceptibilidade à infecção é reduzida com o avançar da idade (PROCTOR et al., 2021; WEESE et al., 2010). Tal fato possui relação com a microbiota imatura dos animais neonatos aliado à maior presença de sais biliares primários (como o taurocolato) que torna os leitões propícios à colonização pelo agente germinado no lúmen intestinal (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; KEEL; SONGER, 2006; PROCTOR et al., 2021; SONGER, 2000). A existência de receptores para os principais fatores de patogenicidade de estirpes toxigênicas de *C. difficile*, as toxinas A (TcdA) e B (TcdB) nos enterócitos de leitões neonatos, é também fator primordial para o desenvolvimento da doença nesta espécie (KEEL; SONGER, 2006; RODRIGUEZ et al., 2016).

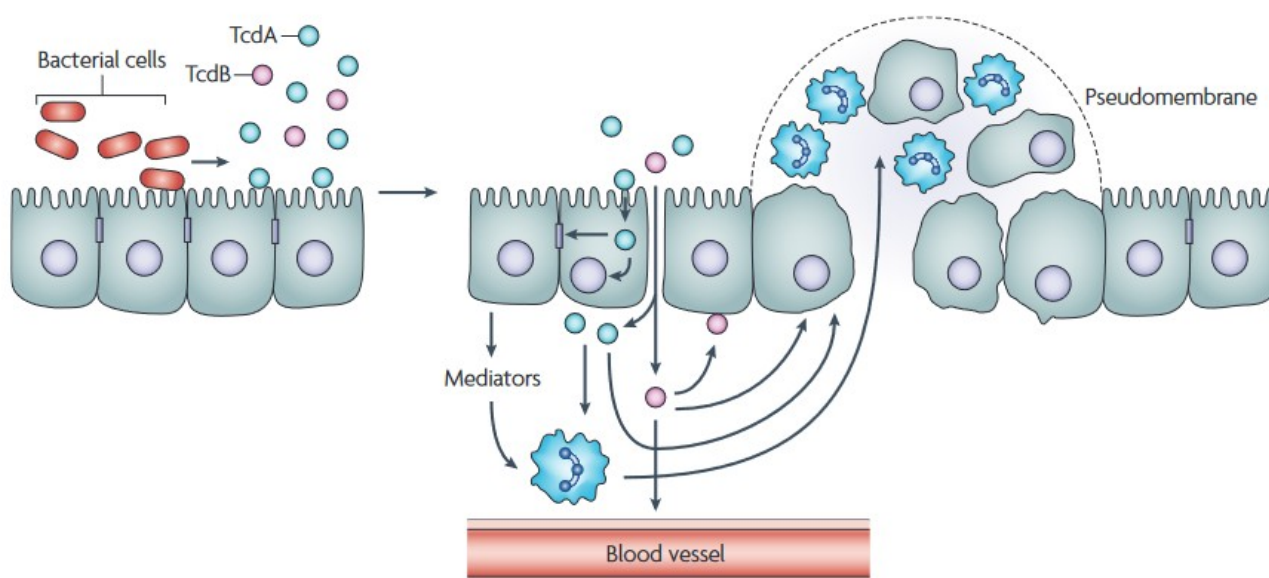
Uma vez secretadas por *C. difficile* e disponíveis no lúmen intestinal, as toxinas A e/ou B, subdivididas em quatro principais porções, utilizam receptores presentes em sua região C-terminal denominados *combined repetitive oligopeptide* (CROP) ou *receptor binding domain* (RBD), para aderir-se à superfícies celulares (Figura 3.3.1) (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; HERNANDEZ et al., 2017; ORTH et al., 2014). Trabalhos demonstram a ligação da região CROP a carboidratos situados na região apical dos enterócitos de hospedeiros susceptíveis, bem como em outras linhagens celulares, como células Vero e HT29 (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; DINGLE et al., 2008; GRECO et al., 2006; GUPTA et al., 2017; TUCKER; WILKINS, 1991). Considerando a maior ocorrência e gravidade das lesões no ceco e cólon ascendente de leitões infectados por *C. difficile* (KEEL; SONGER, 2006) pode-se sugerir que, nessa espécie, os receptores para as toxinas possivelmente concentram-se nestas regiões do trato intestinal.





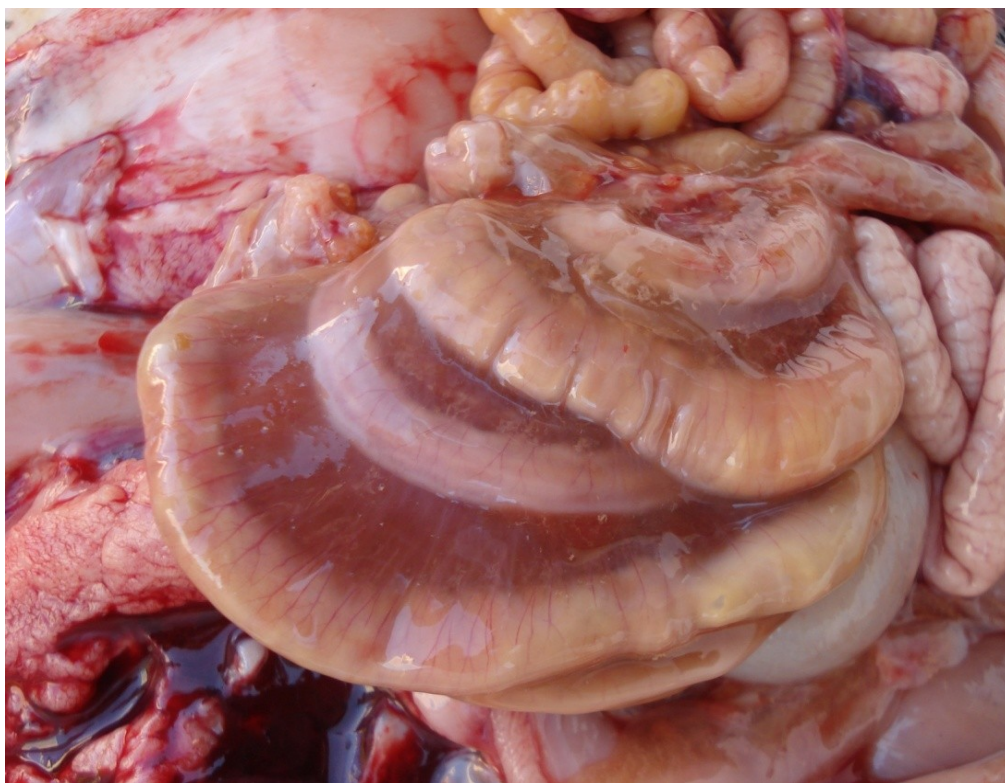
**Figura 3.3.1.** Representação das quatro subdivisões identificadas nas toxinas A (308 kDa) e B (270 kDa) de *C. difficile*. Retirado de CHANDRASEKARAN; LACY, 2017

Por endocitose, as toxinas aderidas aos enterócitos são internalizadas e induzem uma cascata de eventos, que resultam em despolimerização dos filamentos de actina e consequente destruição e necrose do epitélio intestinal (Figura 3.3.2) (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; KEEL; SONGER, 2006). A elevada presença do agente, suas toxinas e a ruptura do epitélio intestinal induzem, ainda, uma intensa resposta inflamatória aguda local (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).



**Figura 3.3.2.** Representação esquemática da cascata de eventos desencadeados pelas toxinas A e B de *C. difficile* a partir de sua internalização pelos enterócitos de hospedeiros susceptíveis à infecção. Retirado de RUPNIK et al., 2009.

Microscopicamente, é comum a visualização de lesões epiteliais em “vulcão”, caracterizadas por notável infiltrado neutrofílico, formação de úlceras e efusão de fibrina para o lúmen intestinal (KEEL; SONGER, 2006; SONGER; ANDERSON, 2006). Tiflocolite, necrose epitelial e principalmente o desenvolvimento de edema de mesocólon em consequência da inflamação exacerbada são alterações macroscópicas comumente visualizadas em leitões infectados (Figura 3.3.3) (SONGER; UZAL, 2005; WATERS et al., 1998; YAEGER; KINYON; SONGER, 2007).



**Figura 3.3.3.** Espaçamento entre alças intestinais decorrente de intensa edemaciação de mesocólon, achado comumente identificado em suínos neonatos infectados por *C. difficile*. Acervo de Laboratório de Anaeróbios.

Conteúdo colônico de consistência pastosa a aquosa e coloração amarelada podem ser observados à necrópsia, apesar de a ocorrência de diarreia não ser um sinal clínico

frequente (SONGER; ANDERSON, 2006) Ao contrário, alguns animais podem apresentar constipação ou podem não apresentar alterações em suas fezes (YAEGER; KINYON; SONGER, 2007). Alguns trabalhos ressaltam, ainda, a possibilidade de detecção do agente toxigênico em fezes de animais saudáveis, apesar de ser uma ocorrência menos frequente (CRUZ JUNIOR et al., 2013; KEESSEN et al., 2011; KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2014). Não obstante, o agente é considerado uma potencial causa de diarreia neonatal em suínos, que é manifestada por aproximadamente 20% dos animais (SONGER, 2004) e dentre outros sinais, podem tornar-se apáticos e apresentar perda de apetite (SONGER; ANDERSON, 2006). O desenvolvimento de hidrotórax e a morte súbita em decorrência da doença também podem ocorrer, apesar de serem alterações incomuns (SONGER; UZAL, 2005).

O impacto da infecção por *C. difficile* na produtividade dos leitões destaca-se como principal prejuízo relacionado a disseminação do agente entre os plantéis. Estudos demonstraram perdas que variam de 10 a 15%, resultantes de considerável redução no ganho de peso e desenvolvimento corpóreo dos animais afetados (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; SONGER; UZAL, 2005).

#### 1                    **3.4. Diagnóstico e tratamento**

Os métodos padrão ouro utilizados como referência ao diagnóstico da infecção por *C. difficile* em seres humanos são a detecção do agente e/ou de seu potencial toxigênico (cultivo toxigênico ou ensaio de toxicidade em células) (PLANCHE et al., 2013; PLANCHE; WILCOX, 2011). Com o decorrer dos anos, métodos menos laboriosos foram desenvolvidos como alternativas aos de referência, que consistem em testes imunocromatográficos de fluxo lateral, ensaios imunoenzimáticos e PCR em tempo real para detecção da proteína constitutiva glutamato desidrogenase (GDH) e/ou detecção das toxinas A e B de *C. difficile* (CROBACH et al., 2016; WILKINS; LYERLY, 2003).

Em função do extenso número de estudos e maior conhecimento da epidemiologia da infecção por *C. difficile* em seres humanos, diretrizes (*guidelines*) que preconizam o diagnóstico em pelo menos duas etapas, com a utilização dos métodos alternativos citados anteriormente, foram padronizados e são utilizados para garantia de maior acurácia na detecção da ICD em pessoas (CROBACH et al., 2009, 2016; GU et al., 2022; MCDONALD et al., 2018).

Em animais, por outro lado, a escassez de dados e a ausência de métodos padronizados para as diferentes espécies torna o diagnóstico da ICD desafiador, podendo resultar, inclusive, em subnotificação de sua ocorrência (CARVALHO et al., 2022; WEESE, 2020b).

Estudos realizados até o momento em suínos apontam uma elevada sensibilidade nos testes atualmente empregados como triagem em seres humanos, como a detecção da proteína constitutiva GDH por testes rápidos ou por ensaios imunoenzimáticos (aproximadamente 100%) (KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2014; RAMOS et al., 2020); contudo, a especificidade com valores próximos a 80% identificada nos estudos citados é considerada inadequada, estando relacionada à possível eliminação de estirpes não toxigênicas de *C. difficile* pelos animais (CRUZ JUNIOR et al., 2013; KEESSEN et al., 2011; KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2014; PUTSATHIT et al., 2019; RAMOS et al., 2020). Neste aspecto, sugere-se a utilização de métodos confirmatórios, que visem a detecção das toxinas A/B de *C. difficile*, conforme empregado em amostras de seres humanos (CROBACH et al., 2016; GU et al., 2022; RAMOS et al., 2020).

Entretanto, apesar de os testes rápidos ou ensaios imunoenzimáticos para detecção de A/B apresentarem elevada especificidade em amostras de suínos, a sensibilidade identificada foi consideravelmente inferior aos dados observados em seres humanos, variando de 5,6% a 54,1% (ANDERSON; SONGER, 2008; KNIGHT; SQUIRE;

RILEY, 2014; RAMOS et al., 2020). Nesse sentido, é sugerida a necessidade do desenvolvimento e padronização de testes confirmatórios adequados para o diagnóstico na espécie suína (KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2014; RAMOS et al., 2020).

Independentemente da técnica empregada para o diagnóstico da infecção nos suínos, diante da possibilidade de detecção do agente toxigênico em animais saudáveis (CRUZ JUNIOR et al., 2013; KEESSEN et al., 2011; KNIGHT; SQUIRE; RILEY, 2014; YAEGER; FUNK; HOFFMAN, 2002), sugere-se que os testes utilizados sejam associados a alterações clínicas e/ou lesões histológicas apresentadas pelos animais (RAMOS et al., 2020; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; SONGER; UZAL, 2005).

Um estudo realizado por Post & Songer (POST; SONGER, 2001) aponta a susceptibilidade de *C. difficile* isolados de leitões a antimicrobianos utilizados em granjas suínas, como tilosina, tiamulina e virginiamicinas. Nesse sentido, é sugerido que a administração destes fármacos junto a alimentos das matrizes ou mesmo parenteralmente em leitões neonatos possa reduzir a eliminação do agente e auxiliar na profilaxia da infecção (POST; SONGER, 2001; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; SONGER; ANDERSON, 2006). Todavia, tais resultados não foram identificados em isolados de suínos de granjas brasileiras, refutando a possibilidade de sua utilização como método de controle da ocorrência da infecção e podendo resultar, inclusive, em pressão seletiva e surgimento de estirpes resistentes a antimicrobianos (SILVA et al., 2014b). Ainda nesse sentido, a utilização de antimicrobianos em leitões para o tratamento da ICD pode ser considerada infundada, já que a microbiota intestinal ainda em formação é tida como principal fator de risco à infecção e a utilização de antimicrobianos acarretaria em maior desequilíbrio (SONGER, 2000).

### 1                    **3.5. Controle e prevenção**

Dado a capacidade de esporulação de *C. difficile*, ações de descontaminação e eliminação do agente são indicados como medidas auxiliares no controle de sua disseminação (AUGUSTYN et al., 2022; GEMEIN et al., 2022). Nesse aspecto, em se tratando de medidas de higiene em criadouros animais, ações como o vazio sanitário (especialmente em plantéis suínos) e a remoção da matéria orgânica são essenciais para redução da contaminação pelo agente (MAYFIELD et al., 2000; MCDONALD et al., 2018; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012). Trabalhos anteriores demonstraram, ainda, o importante papel de animais sinantrópicos, como os roedores, pássaros silvestres ou mesmo insetos, como potenciais carreadores e transmissores do agente a animais confinados (ANDRÉS-LASHERAS et al., 2017; BURT et al., 2012; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2018). Nesse sentido, para minimizar a ocorrência da doença e introdução de novas estirpes, é fundamental que o controle desses animais carreadores ocorra de forma sistemática e eficaz (BURT et al., 2012). Adicionalmente, é de extrema importância a desinfecção do ambiente com desinfetantes eficazes contra as formas germinativa e esporulada, como o hipoclorito de sódio, para a prevenção das infecções em animais e em seres humanos (AUGUSTYN et al., 2022; MAYFIELD et al., 2000; MCDONALD et al., 2018).

Apesar das medidas de controle da disseminação do agente citadas acima, a sua completa eliminação, especialmente em sua forma esporulada, dificilmente ocorre. Desta forma, as medidas de higiene devem ser acompanhadas, idealmente, de ações imunoproláticas para a prevenção da infecção dos animais susceptíveis (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012), igualmente ao que ocorre na prevenção de outras infecções causadas por clostrídios em animais de produção (LIM; KNIGHT; RILEY, 2019).

Estudos prévios demonstraram a associação entre elevados títulos séricos de IgG anti-toxinas A e B de *C. difficile* e a menor ocorrência, gravidade e reincidência da infecção em hospedeiros susceptíveis ao agente, incluindo roedores, suínos e seres humanos (BABCOCK et al., 2006; GIANNASCA et al., 1999; KYNE et al., 2000, 2001; ROBERTS et al., 2012; SPONSELLER et al., 2014). Dado esses achados, foram diversos os testes pré-clínicos realizados em roedores, que tiveram como objetivo a análise da resposta do hospedeiro frente a ICD após a administração parenteral de vacinas compostas por fragmentos ou toxinas A e B inativadas de *C. difficile* (Tabela 3.5.1).

**Tabela 3.5.1.** Modelo animal e imunógenos compostos por toxoides ou fragmentos das toxinas A e B de *C. difficile* desenvolvidos para a prevenção da ICD em estudos pré-clínicos.

<b>Modelo animal</b>	<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
Coelho	Toxoide	(LIBBY; WILKINS, 1982)
Hamster	Toxoide	(FERNIE et al., 1983)
Camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA	(SAUERBORN; LEUKEL; VON EICHEL-STREIBER, 1997)
Hamster	Toxoide	(KIM; IACONIS; ROLFE, 1987)
Hamster	Toxoide	(KIM; ROLFE, 1989)
Hamster	Toxoide	(TORRES et al., 1995)
Hamster	Toxoide	(GIANNASCA et al., 1999)

Camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(BELYI; VARFOLOMEEVA, 2003)
Hamster	Toxoide	(SIDDIQUI et al., 2012)
Hamster	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(TIAN et al., 2012)
Hamster	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(WANG et al., 2012)
Hamster e camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(LEUZZI et al., 2013)
Hamster	Toxoide	(ANOSOVA et al., 2013)
Camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(GHOSE et al., 2013)
Hamster	Proteína recombinante: mutante atóxico TcdA/TcdB	(DONALD et al., 2013)
Hamster	Toxoide A e proteína recombinante: fragmentos TcdB	(KARCZEWSKI et al., 2014)
Hamster	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(WANG et al., 2015)
Hamster	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB e CDT	(SECORE et al., 2017)
Hamster e camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(TIAN et al., 2017)
Camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(WANG et al., 2018)
Camundongo	Proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(LUO et al., 2019)



Camundongo	Proteína recombinante: mutante atóxico TcdB	(BLAND et al., 2019)
Camundongo	Vetor YS1646 e proteína recombinante: fragmentos TcdA/TcdB	(WINTER et al., 2019)
Camundongo	Toxoide	(AMINZADEH et al., 2020)

Em geral, a vacinação dos roedores utilizando toxinas inativadas de *C. difficile* demonstraram resultados favoráveis, tornando-as potenciais imunógenos para o controle da doença em espécies susceptíveis ((AMINZADEH et al., 2020; ANOSOVA et al., 2013; GIANNASCA et al., 1999; SIDDIQUI et al., 2012). Da mesma forma, a imunização de animais com proteínas recombinantes contendo fragmentos das toxinas A e B apresentaram resultados promissores (LEUZZI et al., 2013; SPENCER et al., 2014; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2018). Foi identificado o estímulo à produção de imunoglobulinas G capazes de neutralizar as toxinas A e B, bem como reduzidos graus de lesão e taxas de mortalidade dos roedores desafiados, que variaram de 0 a 45% (AMINZADEH et al., 2020; DONALD et al., 2013; KARCZEWSKI et al., 2014; LUO et al., 2019; SECORE et al., 2017; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2018, 2015).

Apesar de favoráveis, os resultados observados destacam elevada variação em relação às taxas de mortalidade dos animais após o desafio; tal fato pode ser consequência de diferentes esquemas vacinais, doses de antígenos e desafios realizados, bem como quanto a susceptibilidade dos hospedeiros utilizados nos ensaios (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; KARCZEWSKI et al., 2014). Nesse sentido, já foi demonstrada a maior susceptibilidade de hamsters (*Mesocricetus auratus*) à ICD se comparado a outras espécies animais (KEEL; SONGER, 2006), motivo pelo

qual estudiosos optam pela utilização desta espécie como modelo para avaliação da virulência do agente (DONALD et al., 2013; WANG et al., 2015). Em consequência, é superior a sensibilidade associada à utilização de hamsters em ensaios de imunização, demonstrada pela maior taxa de letalidade após o desafio se comparado a outros modelos animais (BABCOCK et al., 2006; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2018). De todo modo, é apontado pelos estudos a produção de anticorpos capazes de neutralizar as toxinas e impedir a sua atividade *in vivo* e *in vitro* nesta e em outras espécies (ANOSOVA et al., 2013; DONALD et al., 2013; LUO et al., 2019; SAUERBORN; LEUKEL; VON EICHEL-STREIBER, 1997; SECORE et al., 2017; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2018, 2015).

É de se destacar as vantagens da produção de proteínas recombinantes quando comparado às vacinas compostas por toxinas inativadas, apesar da observação de resultados favoráveis em ambas as composições. Estudos ressaltam os desafios associados à produção dos toxoides, tais como os custos relacionados às produções em larga escala, elevada variação entre lotes e riscos relacionados à manipulação do agente toxigênico e de suas proteínas em sua fase tóxica (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; DONALD et al., 2013; KARCZEWSKI et al., 2014). Por outro lado, trabalhos ressaltam que a tecnologia de proteínas recombinantes permite a produção e purificação de alvos imunogênicos, podendo conferir um alto rendimento e sem os riscos que manipulação de agentes patogênicos oferecem (DONALD et al., 2013; KARCZEWSKI et al., 2014; KARYAL et al., 2021; WANG et al., 2015). Independentemente das vantagens ou desvantagens relacionadas às tecnologias empregadas, dado os resultados favoráveis observados nos estudos citados, testes clínicos em seres humanos empregando parenteralmente toxoides ou proteínas

recombinantes de TcdA e TcdB de *C. difficile* estão em andamento (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; REIGADAS et al., 2021).

A colonização do epitélio colônico por *C. difficile* toxigênico é etapa essencial para a ocorrência de estímulos à produção das toxinas A e/ou B pelo agente e consequente desenvolvimento de lesões intestinais (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; STONE et al., 2019). Estudos apontam o desequilíbrio da microbiota intestinal como um importante fator de risco à colonização por *C. difficile* (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; RILEY; LYRAS; DOUCE, 2019), sendo a utilização de antimicrobianos e a microbiota em formação de neonatos de determinadas espécies, como em leitões, fatores que aumentam a susceptibilidade a infecção (KEEL; SONGER, 2006; WEESE, 2020b). Dessa forma, métodos que visem o controle da doença a partir da prevenção da colonização de hospedeiros susceptíveis por *C. difficile* vêm sendo estudados. Ensaios pré clínicos de imunógenos e outros métodos profiláticos em roedores, descritos na literatura, estão listados na tabela 3.5.2.

**Tabela 3.5.2.** Modelo animal e composição de métodos e/ou imunógenos elaborados para a prevenção da colonização por *C. difficile* em ensaios pré-clínicos.

<b>Modelo animal</b>	<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
Hamster	<i>C. difficile</i> não toxigênico (NTCD)	(WILSON; SHEAGREN, 1983)
Hamster	<i>C. difficile</i> não toxigênico (NTCD)	(SAMBOL et al., 2002)
Hamster e camundongo	Extrato da proteínas de membrana (SLP) purificadas	(NÍ EIDHIN et al., 2008)
Hamster	Recombinante: proteína de membrana celular CWP84	(PÉCHINÉ et al., 2011)
Camundongo e coelho	Extrato de ácido lipoteicoico (LTA) purificado	(COX et al., 2013)
Hamster	<i>C. difficile</i> não toxigênico (NTCD)	(NAGARO et al., 2013)
Hamster	<i>C. difficile</i> não toxigênico (NTCD)	(OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016)
Hamster e camundongo	Recombinante: proteínas de esporo CdeC e CdeM	(GHOSE et al., 2016)
Camundongo	Sintético: Polissacarídeos de membrana celular PSI, PSII e PSIII	(BROECKER et al., 2019)
Camundongo	Recombinante: lipoproteína de membrana celular CD0873	(BRADSHAW et al., 2019)
Camundongo	Recombinante: fração da proteína BclA2 e 3 de superfície de esporos	(MAIA et al., 2020)

---

Hamster	Lipossoma conjugado a proteína de membrana celular CD0873	(KARYAL et al., 2021)
---------	---	-----------------------

---

Diferentemente dos estudos que tiveram como objetivo a prevenção da ICD através da imunização contra os principais fatores de virulência de *C. difficile* (toxinas A e B), existem menos trabalhos relacionados a métodos imunoproliféricos que previnam colonização intestinal pelo agente. Comparativamente às vacinas baseadas em toxinas, observou-se uma menor proteção dos hospedeiros contra a infecção (MAIA et al., 2020; NÍ EIDHIN et al., 2008; PÉCHINÉ et al., 2011), apesar da demonstração de títulos séricos de IgG anti-*C. difficile* (BRADSHAW et al., 2019; GHOSE et al., 2016; KARYAL et al., 2021; MAIA et al., 2020). É possível inferir que a proteção contra o *C. difficile*, de forma a reduzir a colonização intestinal, é uma estratégia que pode ser aliada à prevenção da infecção e sinais clínicos causados pelo agente toxigênico (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; RAZIM; GÓRSKA; GAMIAN, 2023). Entretanto, os autores ressaltam que os trabalhos existentes são ainda incipientes, sendo necessária a realização de mais estudos para avaliação da prevenção da colonização, bem como infecção pelo patógeno (BROECKER et al., 2019; COX et al., 2013; GHOSE et al., 2016, p. 201; NÍ EIDHIN et al., 2008).

Contrastando com os resultados obtidos em métodos imunoproliféricos citados acima, a prevenção da colonização por *C. difficile* utilizando de estirpes não toxigênicas (NTCD) em modelo hamster apresentou resultados promissores (NAGARO et al., 2013; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; SAMBOL et al., 2002; WILSON; SHEAGREN, 1983). Observou-se que o fornecimento oral de esporos de NTCD, seguido do desafio com estirpes toxigênicas aos animais susceptíveis, foi capaz de prevenir a colonização pelo patógeno (NAGARO et al., 2013; SAMBOL et al., 2002; WILSON; SHEAGREN,

1983), reduzindo a detecção das toxinas A e B e conseqüentemente as alterações clínicas e mortalidade pelo agente (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). Nesse aspecto, estudos sugerem que o fornecimento de estirpes não toxigênicas e a sua colonização no epitélio intestinal provoque uma posterior exclusão das estirpes toxigênicas, que pode ocorrer por competição nutricional e/ou por habilidade de aderência (MERRIGAN et al., 2003; MILLS; RAO; YOUNG, 2018; SAMBOL et al., 2002; SONGER et al., 2007).

Diversos são os estudos realizados em suínos que avaliaram o uso terapêutico de anticorpos posteriormente ao desafio por *C. difficile* e/ou inoculação de suas toxinas, tendo como principais objetivos a análise da aplicabilidade destas imunoglobulinas em casos recorrentes da ICD em pacientes humanos (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b). Tais pesquisas foram conduzidos com a utilização de imunoglobulinas IgG monoclonais (COHEN et al., 2014) ou gerados após imunização ativa de bovinos com vacina composta por quimera recombinante de TcdA e TcdB (SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013b; WANG et al., 2012). A utilização de modelos suínos são consequência da similaridade fisiológica que possuem, com os seres humanos, em seu trato digestivo e sistema imunológico, além de semelhante evolução clínica e alterações histopatológicas observadas em leitões desafiados, caracterizadas principalmente pelo desenvolvimento da colite pseudomembranosa (NYBLADE et al., 2022; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2010). Considerando, ainda, o impacto relacionado à saúde e produtividade de suínos neonatos, estudos para o desenvolvimento de métodos preventivos a colonização e ocorrência da ICD em leitões têm sido conduzidos. Estão demonstrados na tabela 3.5.3 a composição, finalidade, via de inoculação e respectivas referências dos trabalhos executados até o momento.

**Tabela 3.5.3.** Composição, finalidade, via de inoculação e referências de estudos de métodos profiláticos ou terapêuticos aplicados em suínos.

<b>Composição</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Via</b>	<b>Referência</b>
NTCD	Profilática	Oral	(SONGER et al., 2007)
Antitoxinas A/B	Terapêutica	Intraperitoneal	(STEELE et al., 2013a, 2013b)
Antitoxinas A/B	Terapêutica	Intraperitoneal	(COHEN et al., 2014)
Antitoxinas A/B	Terapêutica	Oral	(SPONSELLER et al., 2014)
NTCD	Profilática	Oral	(OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019a, 2019b)
Toxoide A/B	Imunoprofilática	Subcutânea	Dados não publicados (2021)

Foi recentemente desenvolvida e aprovada para o uso em suínos uma vacina composta por toxoides A e B de *C. difficile*, adicionalmente à toxina alfa de *C. perfringens*, denominada Suiseng® Diff/A (Hipra, ESP). Elaborada para a aplicação em matrizes gestantes e prevenção da diarreia neonatal por *C. difficile* em leitões através da transferência passiva de imunidade, um estudo clínico de fase I realizado pela Suiseng® Diff/A (Hipra, ESP) relatou reduzida mortalidade, sinais clínicos e lesões macroscópicas nos animais colostrados e desafiados (dados não publicados). Mesmo sendo a primeira vacina contra *C. difficile* que teve a sua utilização autorizada, não existem estudos publicados que demonstrem a sua eficácia em um ambiente cuja ocorrência da ICD é considerada de elevada prevalência. Portanto, dados de diagnóstico da ICD em granjas positivas para a infecção, posteriormente à imunização dos animais, são desconhecidos.

Os estudos que avaliaram a proteção passiva pela administração de imunoglobulinas a leitões desafiados pelo agente ou suas toxinas demonstraram reduzida ocorrência de mortalidade, sinais clínicos e alterações macro e microscópicas no epitélio colônico comumente observadas nestes animais (KEEL; SONGER, 2006). Desta forma, é possível deduzir que a presença de anticorpos anti-toxinas A e B, sejam elas induzidas ativamente e/ou passivamente transferidas, podem ser capazes de proteger os animais dos sinais clínicos e perdas associadas à ICD.

Considerando que a colonização assintomática por estirpes não toxigênicas de *C. difficile* é capaz de reduzir o risco do desenvolvimento da ICD e diarreia pelo agente em roedores (MILLS; RAO; YOUNG, 2018; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; SAMBOL et al., 2002), estudos foram conduzidos em leitões para avaliação da proteção nessa espécie. Foram testados o fornecimento de NTCD a leitões neonatos pela via oral, logo após o seu nascimento, em granjas comerciais positivas para a ICD (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019b; SONGER et al., 2007) ou seguido de desafio dos animais (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019a). Similarmente ao identificado em estudos com foco em imunoprofilaxia, todos os parâmetros analisados (sinais clínicos, lesões macro e microscópicas) foram significativamente inferiores em animais que receberam as estirpes não toxigênicas (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019a, 2019b; SONGER et al., 2007). Entretanto, diferentemente do observado por Songer e colaboradores (2007), o estudo de Oliveira Júnior (2019b) destacou a identificação da estirpe não toxigênica em animais não inoculados com o agente, sugerindo uma proteção indireta daqueles susceptíveis através da aquisição de NTCD eliminados no ambiente.

Apesar de resultados promissores após a administração de estirpes não toxigênicas, complicações ou efeitos indesejáveis decorrentes desse método profilático ainda são desconhecidos. Sugere-se que a colonização por NTCD seja transiente e, como efeito, a



proteção não seja duradoura (GERDING et al., 2015; MILLS; RAO; YOUNG, 2018). Todavia, considerando que o tratamento dos leitões ocorre logo após o seu nascimento, tal hipótese não deve ser considerada problemática, dado a ocorrência da doença na espécie predominantemente em seus primeiros sete dias de vida (KEEL; SONGER, 2006). Por outro lado, alguns trabalhos sugerem o potencial de aquisição, pelas estirpes não toxigênicas, de determinantes de virulência através de transferência horizontal de elementos genéticos móveis, tornando-as, ao contrário, um possível risco ao plantel (BROUWER et al., 2013; MERRIGAN et al., 2003; MILLS; RAO; YOUNG, 2018), possibilidade que deve ser estudada e considerada previamente ao tratamento dos animais.

Conforme colocado anteriormente, foi demonstrada a associação entre a presença de anticorpos sistêmicos anti-toxinas A e B de *C. difficile* e menores taxas de infecção ou reincidência de casos (KYNE et al., 2000, 2001; LEAV et al., 2010; STEELE et al., 2013a). Em busca de um potencial imunógeno que induza proteção contra os principais fatores de virulência de *C. difficile*, trabalhos avaliaram a antigenicidade de diferentes porções das toxinas A e B. Nesse sentido, foi demonstrado que até 90% da imunorreatividade concentra-se em sua porção C-terminal, sugerindo a presença de epítomos imunodominantes na região CROP (HERNANDEZ et al., 2017; KINK; WILLIAMS, 1998; ORTH et al., 2014). Dentre os anticorpos estudados e capazes de neutralizar as toxinas A/B, *bezlotoxumab* (ZINPLAVA, Merck Sharp & Dohme, UK) se destaca por ligar-se fortemente à região CROP da toxina B, sendo licenciado para o tratamento da infecção recorrente por *C. difficile* (BABCOCK et al., 2006; BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; HERNANDEZ et al., 2017; ORTH et al., 2014). Dessa forma, tal região destaca-se como potencial alvo para a síntese de imunógenos para a prevenção de ICD em diversos hospedeiros, incluindo leitões

neonatos, cuja imunização passiva através do colostro de matrizes ativamente imunizadas possivelmente os protegeria da infecção pelo agente.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Construção do inserto, clonagem e produção de proteínas recombinantes contendo fragmentos das toxinas A e B de *Clostridioides difficile*

#### 4.1.1. Construção e caracterização do inserto plasmideal

Para a síntese da vacina recombinante bivalente, composta por fragmentos de TcdA e de TcdB, bem como produção de uma quimera, contendo a junção dos fragmentos presentes na vacina bivalente, foram selecionadas regiões previamente caracterizadas como imunodominantes, presentes na porção C-terminal (região CROP) das toxinas A e B (estirpe VPI10463 / CD630) (BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; DINGLE et al., 2008; DONALD et al., 2013; GRECO et al., 2006; GUPTA et al., 2017; HERNANDEZ et al., 2017; HO et al., 2005; HUSSACK et al., 2011; ORTH et al., 2014). A verificação da antigenicidade e hidrofobicidade destas sequências de TcdA e TcdB foi realizada pelo programa BepiPred 2.0 (CBS, DEN) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), seguido de otimização das sequências de nucleotídeos para expressão em *E. coli* e conferência dos aminoácidos que posteriormente seriam sintetizados, através do programa GCUA 2.0 (Thomas Schödl, GER) ([http://gcu.schoedl.de/sequential\\_v2.html](http://gcu.schoedl.de/sequential_v2.html)).

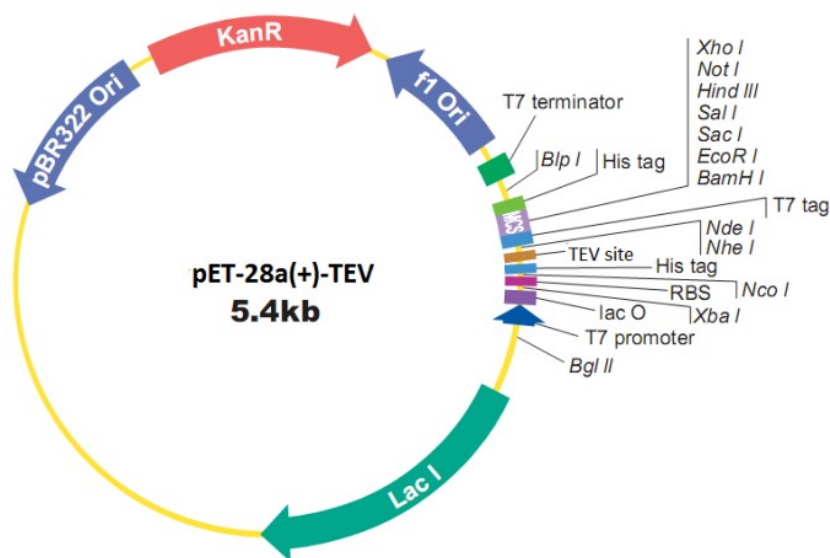
As sequência dos aminoácidos que seriam traduzidos por *E. coli* foram visualizadas pelo programa Expasy (Swiss Institute of Bioinformatics, SWI) (<https://web.expasy.org/translate/>), seguido de verificação do alinhamento entre as sequências obtidas pelo Expasy e as sequências originárias de *C. difficile* pelo software MAFFT 7.4.2 (Kazutaka Katoh, JPN) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Tal alinhamento foi necessário para verificação da concordância entre as sequências que

seriam expressas e os aminoácidos que compõem as proteínas da região CROP das toxinas A e B de *C. difficile*.

A escolha dos sítios de restrição para a incorporação dos fragmentos de TcdA e TcdB ao sítio de clonagem do vetor de expressão ocorreu com o auxílio do programa Restriction Analyzer (Molbiotools, CZE) (<http://www.molbiotools.com/restrictionanalyzer.html>). Os genes codificadores dos fragmentos CROP das toxinas A e B foram externamente sintetizados e encaminhados junto ao vetor de clonagem pUC57 (GenScript, KR), seguido de transformação bacteriana através de eletroporação (1,8 kV) (MicroPulser, Bio-Rad, USA) em estirpes de clonagem XL1-*blue*, para criopreservação até a sua utilização.

#### 1 4.1.2. Transformação bacteriana e clonagem em Arctic Express e BL21

Para dar início à manipulação das sequências de TcdA e TcdB presentes no vetor pUC57, as células XL1-*blue* contendo o referido vetor foram submetidas a extração plasmideal com o auxílio do kit QIAprep Spin MiniprepA (Qiagen, USA). Seguido da verificação da presença e pureza do DNA plasmideal em espectrofotometro (Nanovue, GE, USA), o material genético foi submetido a digestão com a utilização de enzimas de restrição para obtenção das sequências de interesse, que foram inseridas ao vetor de expressão pET28a-TEV (Novagen, USA) com o auxílio de enzimas de ligação (DNA ligase). Tal vetor é caracterizado por conter sequências codificadoras de histidina (6XHis-tag), gene promotor *lac*, gene de resistência a kanamicina bem como os sítios de restrição selecionados para a incorporação das sequências de TcdA e TcdB de *C. difficile* (Figura 4.1.2.1)

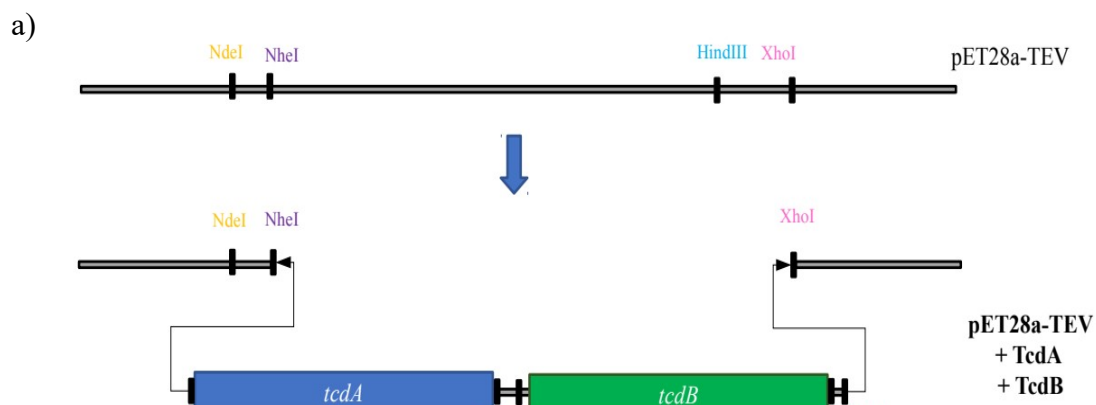


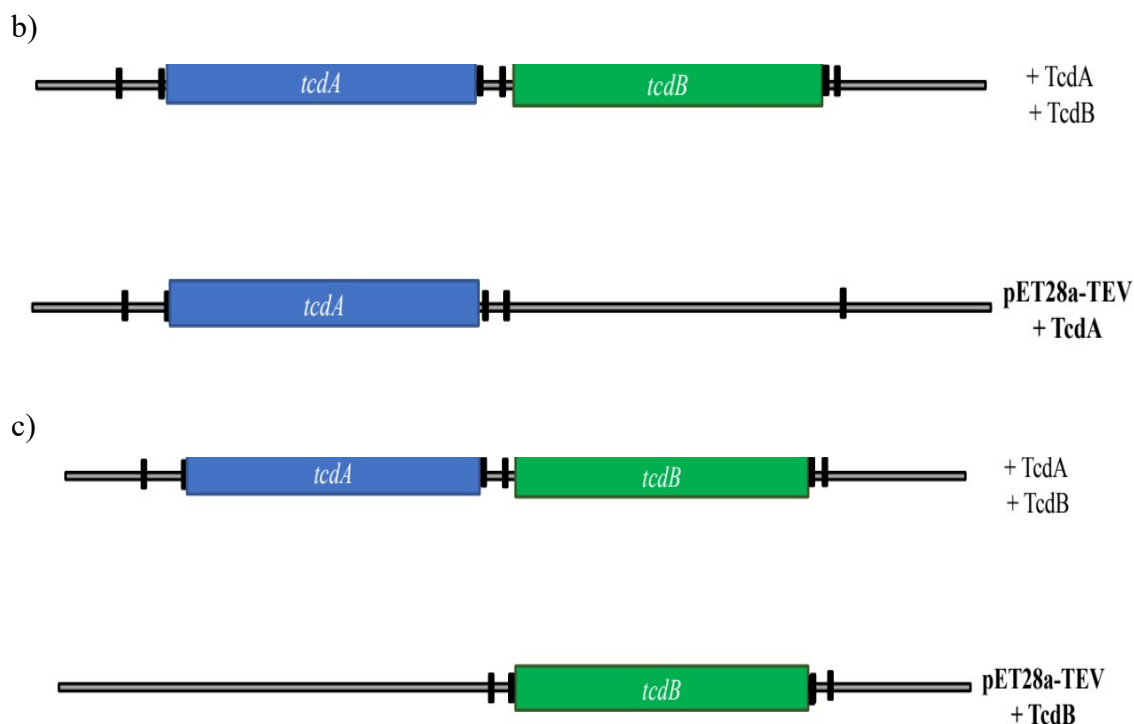
**Figura 4.1.2.1** Principais componentes presentes no vetor plasmidial pet28a-TEV (Novagen, USA). Adaptado de: <https://www.genscript.com/>.

Inicialmente, foi realizada a elaboração do plasmídeo pet28a-TEV contendo as sequências imunodominantes de TcdA + TcdB da vacina quimérica (equivalentes a 2300 pares de bases), a partir da utilização das enzimas de restrição NheI e XhoI (Figura 4.1.2.2.a). O plasmídeo pet28a-TEV contendo as sequências de TcdA e TcdB foi então inserido ao hospedeiro de expressão *E. coli* Arctic Express (DE3) (Stratagene, USA) por transformação bacteriana. A estirpe Arctic Express (DE3) é considerada uma boa opção para a síntese de proteínas solúveis, com auxílio a um correto enovelamento proteico e prevenção da formação de corpos de inclusão, através da formação e atuação de chaperoninas entre 4° C e 12° C (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; PACHECO et al., 2012; VALLEJO; RINAS, 2004).

Iniciou-se, então, a manipulação genética dos clones contendo pet28a-TEV junto à quimera de TcdA + TcdB, para a síntese dos clones carreadores de sequências para a produção da vacina bivalente. Desta forma, foi executada a etapa para obtenção de estirpes com o vetor pet28a-TEV para expressão apenas do fragmento TcdA. Clones de

Arctic Express (DE3) transformados, contendo TcdA + TcdB, foram submetidos a extração plasmideal, seguido de digestão com a utilização da enzima HindIII, conforme ilustrado na Figura 4.1.2.2.b, para a retirada do fragmento de TcdB do vetor. Realizada a ligação do DNA plasmideal, o material genético contendo apenas o fragmento de TcdA foi então novamente transformado em estirpe de expressão Arctic Express (DE3). Similarmente, para a obtenção de vetor contendo apenas a sequência referente a TcdB, a extração plasmideal de clones bacterianos contendo pet28a-TEV junto a TcdA + TcdB foi também utilizada para a digestão e retirada do fragmento de TcdA, com a utilização da enzima NdeI (Figura 4.1.2.2.c). Neste caso, porém, a transformação bacteriana ocorreu em cepas BL21 (Thermo Fisher, USA) de *E. coli*, como será discutido adiante. A estirpe BL21 apresenta elevada versatilidade e é amplamente utilizada para a expressão de proteínas recombinantes heterólogas, apresentando temperaturas de crescimento e expressão proteica de aproximadamente 37° C (CHART et al., 2000; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Para inferência de que a transformação bacteriana ocorreu nas três situações citadas acima, 10 µL da suspensão bacteriana submetida à eletroporação foram plaqueados em ágar triptona e extrato de levedura (2x YZ) contendo 50 mg de sulfato de kanamicina a cada litro de meio de cultivo. As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C por 24h e colônias bacterianas foram isoladas para posterior identificação da presença dos insertos (FONSECA et al., 2014; MAASS et al., 2007).





**Figura 4.1.2.2.** a) Esquematização do processo de digestão do plasmídeo pET28a-TEV e fragmentos de nucleotídeos de TcdA e TcdB por enzimas de restrição NheI e XhoI, para construção da quimera pET28a-TEV+TcdA+TcdB; b) Digestão da quimera pET28a-TEV+TcdA+TcdB com a enzima HindIII para construção do plasmídeo pET28a-TEV+TcdA; c) Digestão da quimera pET28a-TEV+TcdA+TcdB com a enzima NdeI para construção do plasmídeo pET28a-TEV+TcdB.

A inferência da presença dos insertos nos clones celulares ocorreu por PCR da região flanqueadora T7 forward (5'TAATACGACTCACTATAGGG 29 3') e T7 reverse (5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'), seguido de identificação dos respectivos fragmentos genéticos de TcdA+TcdB (2300 pb), TcdA (1500 pb) e TcdB (800 pb) por eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados, revelados por brometo de etídio (10mg/mL) (ThermoFisher, USA) em transiluminador UV-B (L-PIX EX Loccus, BRA) (MAASS et al., 2007).

1

#### 4.1.3. Expressão, purificação e caracterização das proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas de interesse, uma etapa inicial de pré-inoculação foi realizada com antecedência de 16 horas ao dia da expressão proteica por indução bacteriana. Nesse sentido, uma unidade formadora de colônia dos clones de Arctic Express ou BL21 foram incubados em caldo 2x YZ contendo 50 mg/L de sulfato de kanamicina por a 37°C sob agitação (180 rpm). Passadas 16 horas, a suspensão bacteriana foi inoculada em 1 L de caldo 2x YZ contendo 50 mg de sulfato de kanamicina em uma proporção 1:4, seguido de incubação a 37 °C sob agitação (CASTRO et al., 2021; FONSECA et al., 2014). Ao observar densidade óptica entre 0,6 e 0,8 em espectrofotômetro a 600 nm (Ultrospec 10, Amersham Biosc GE, USA), foi iniciada a indução a expressão proteica a partir da adição de 1 M de isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). A suspensão bacteriana contendo Arctic Express foi submetida a incubação por 16 h a 12 °C, enquanto o caldo contendo BL21, para a síntese de fragmentos de TcdB, foi incubado por 3 h a 37 °C, ambos sob agitação (180 rpm) (DHOM-LEMOS et al., 2019).

Feita a indução, os inóculos foram centrifugados a 2000 g por 30 min a 4 °C e os *pellets* bacterianos foram suspensos em tampão PBS contendo 30 mM de imidazol e 10 mg de lisozima. A completa lise das bactérias foi realizada por homogeneização através do equipamento EmulsiFlex-C3 *homogenizer* (Avestin EmulsiFlex™ C3, Ata Scientific, AUS). As proteínas recombinantes TcdA, TcdB e a quimera TcdA+TcdB com fragmentos de histidina em sua porção N-terminal foram purificadas em cromatografia por afinidade pelo sistema AKTAprime plus (GE Healthcare, USA), utilizando-se a coluna HisTrap HP Ni<sup>+</sup> de 5 mL acoplada ao sistema. A eluição das proteínas ocorreu em solução contendo tampão PBS e 0,5 M de imidazol, mesma solução utilizada para o



seu armazenamento sob refrigeração (CASTRO et al., 2021; DHOM-LEMOS et al., 2019; FONSECA et al., 2014).

As predição de presença das proteínas, pureza e solubilidade foram realizados por visualização em gel SDS-PAGE 10% e *Western Blot* com a utilização de anticorpo primário anti-Histidina. A quantificação proteica ocorreu pelo método BCA, com a utilização do kit *BCA protein assay* (Thermo Fisher, USA) (CASTRO et al., 2021).

#### 1                   4.1.4. Testes de esterilidade e inocuidade em células

As proteínas recombinantes purificadas foram testadas quanto a sua esterilidade em caldo tioglicolato e caldo *sabouraud*, com incubação por 14 dias em anaerobiose e aerobiose (BRASIL, 1997). A inocuidade das proteínas foi testada em células, em triplicata, utilizando-se a linhagem celular VERO (ATCC CCL-81) cultivada em meio essencial mínimo (MEM, Gibco, USA) suplementado com soro fetal bovino (5%), penicilina (40.000UI/mL) e estreptomicina (20.000UI/mL), realizado em triplicata (HANG'OMBE et al., 2000; SALVARANI et al., 2010). A linhagem celular (6,0 x 10<sup>4</sup>/poço) foi cultivada em estufa a 37°C e atmosfera controlada de 5% CO<sub>2</sub> utilizando-se placa de 96 poços (Sarstedt, USA), junto a 160 µL das suspensões proteicas diluídas em série na base 2 (100 µg, 50 µg, 25 µg e 12,5 µg). A inocuidade foi definida como a ausência de efeito citotóxico após 72 horas de incubação (SALVARANI et al., 2010).

#### 2                   4.2. Imunização de hamsters e análise da potência das proteínas 3 recombinantes em um modelo experimental de infecção por *C. difficile*

A execução desse projeto contou com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo nº 277/2020.

#### 1 4.2.1. Local de execução experimento

O estudo em hamsters contou com a participação de cinco grupos experimentais contendo, em cada grupo, sete fêmeas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) (35 hamsters), com quatro a oito semanas de idade (SILVA et al., 2014a), conforme cálculo amostral realizado (CHARAN; KANTHARIA, 2013). Os animais foram inicialmente acondicionados em grupo, seguido de acondicionamento em gaiolas individuais para a sua sensibilização e desafio (Figura 4.2.1.1). As gaiolas foram previamente esterilizadas por autoclavação (121°C/20min) e foram situadas em estantes ventiladas e equipadas com filtros absolutos do Laboratório de Soros e Vacinas da Escola de Veterinária da UFMG. As gaiolas foram cobertas por camada de maravalha estéril, trocada semanalmente ou bisemanalmente, e os animais receberam ração e água *ad libidum* estéreis.



**Figura 4.2.1.1.** Isolador situado no Laboratório de Soros e Vacinas da Escola de Veterinária da UFMG e utilizado para o acondicionamento individual dos animais sensibilizados e desafiados por *C. difficile*. Fonte: arquivo pessoal.

#### 1            4.2.2. Imunização

Os hamsters foram aleatoriamente selecionados para composição dos grupos experimentais, que foram: (i) controle (não vacinado e desafiado); (ii) tratamento AB1; (iii) tratamento AB2; (iv) tratamento Q1; (v) tratamento Q2. A composição vacinal e doses utilizadas em cada um dos tratamentos estão contidos na tabela 4.2.2.1. Todos os

grupos receberam, em adição aos imunizantes/solução salina, 100 µg do adjuvante hidróxido de alumínio, comumente utilizado em vacinas veterinárias brasileiras.

**Tabela 4.2.2.1.** Grupos de hamsters sírios utilizados para avaliação da potência das vacinas recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*.

<b>Grupo</b>	<b>Inóculo</b>	<b>Composição vacinal</b>	<b>Dose</b>	<b>Desafio</b>
Controle	Salina	N/A	0,85%	Presente
Tratamento AB1	Bivalente	Proteína A + Proteína B	10 µg	Presente
Tratamento AB2	Bivalente	Proteína A + Proteína B	50 µg	Presente
Tratamento Q1	Quimera	Proteína AB	10 µg	Presente
Tratamento Q2	Quimera	Proteína AB	50 µg	Presente

A escolha das doses imunizantes foi baseada em trabalhos anteriormente realizados, em que imunógenos recombinantes de *C. difficile* foram testados em hamsters sírios (DONALD et al., 2013; SECORE et al., 2017; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2012, 2015). Foram realizados três tempos de imunização subcutânea, intervalados por 14 dias. A primeira inoculação foi executada uma semana após aclimação dos animais, que foram observados diariamente desde os primeiros dias após a imunização. A ocorrência de sinais clínicos nos primeiros dias após as imunizações, como apatia e menor consumo de alimentos, bem como alterações no local de inoculação, foi cautelosamente observada.

#### 1                   4.2.3. *Produção dos esporos*

A avaliação da potência das vacinas recombinantes foi realizado através de desafio dos hamsters com esporos de *C. difficile* RT014/020, comumente identificados em suínos infectados no Brasil (SILVA et al., 2014a). Conforme o padronizado por YANG e colaboradores (2009), um dois tubos estéreis contendo 40 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco Laboratories, EUA) foi utilizado para cultivo em anaerobiose (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) das estirpes a 37°C por 6 dias. Após o período, cultura foi mantida por 5 dias em temperatura ambiente e aerobiose para induzir a esporulação do agente. As soluções foram submetidas a centrifugação a 3.000 x g a 4°C por 30 minutos e posteriormente suspensas em 5 mL de salina esterilizada a 0,85%, procedimento que foi repetido por 6 vezes. Para a eliminação de células vegetativas, a suspensão foi incubada a 70°C por 20 minutos, seguido de novo protocolo de centrifugação e suspensão em solução salina (SILVA et al., 2014a; YANG; CROW-WILLARD; PONCE, 2009).

Os esporos foram avaliados por meio de coloração de Gram. A determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL para determinação da dose infectante ocorreu por diluições seriadas em salina 0,85% na base 10 (variando de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>). As soluções diluídas foram plaqueadas em ágar sangue e incubadas por 48 horas em anaerobiose. Placas contendo 30 a 300 UFC foram contadas e a média de esporos/mL foi calculada (SILVA et al., 2014a). A solução contendo os esporos foi mantida a -20°C até a sua utilização.

#### 2                   4.2.4. *Sensibilização dos hamsters e desafio*

Após 14 dias da última imunização, todos os animais foram sensibilizados à infecção por *C. difficile* com 30 mg/kg de clindamicina pela via intramuscular, para a

depleção de sua microbiota intestinal (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). Decorridas 24 horas, os hamsters foram desafiados com  $8 \times 10^6$  esporos de *C. difficile* RT014/020 em 100  $\mu$ L de solução salina via gavagem (SILVA et al., 2014a). Os animais foram observados diariamente a cada 6 horas e durante 8 dias. Manifestações clínicas tais como apatia, anorexia, pelos arrepiados, postura curva, diarreia (fezes amolecidas na gaiola e cauda com sujidades indicativas) e morte foram anotados (KUEHNE et al., 2010; SILVA et al., 2014a). Até o oitavo dia de experimento, os animais que apresentaram sinais graves, tais como relutância ao movimento e estado comatoso, bem como os animais que não sucumbirem à infecção foram eutanasiados com dose letal de cetamina 10% (600mg/kg) associado a xilazina 2% (30mg/kg) pela via intraperitoneal (BRASIL, 2018; KUEHNE et al., 2010). Após a eutanásia ou morte natural, todos os animais foram submetidos à necrópsia para avaliação das alterações macroscópicas induzidas pelo agente, adicionalmente a coleta de conteúdo cecal e colônico para isolamento e caracterização de *C. difficile* (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). A análise de proteção dos hamsters e observação do tratamento responsável pela maior sobrevivência após desafio pelo agente ocorreu com a construção de gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier, com o auxílio do teste de Mantel-Cox (KISHORE; GOEL; KHANNA, 2010).

#### 1                    **4.3. Imunização de coelhos e suínos e análise da produção de anticorpos** 2                    **anti-TcdA e anti-TcdB recombinantes por ensaio imunoenzimático**

A execução desse projeto contou com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo nº 277/2020.

### 1 4.3.1. Local de execução dos experimentos

A realização dos estudos com coelhos (raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculuse*) ocorreu no setor de cunicultura da Fazenda Experimental prof. Hélio Barbosa (Escola de Veterinária/UFMG). Os animais ingressaram ao experimento com aproximadamente 8 semanas e foram acondicionados em gaiolas individuais, identificadas de acordo com o grupo ao qual pertenciam (Figura 4.3.1.1). Água e ração foram fornecidos *ad libidum*.



**Figura 4.3.1.1.** Acondicionamento individual e respectivas identificações de coelhos Nova Zelândia submetidos a experimentação, realizada no setor de cunicultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG. Fonte: arquivo pessoal.

Matrizes suínas prenhas da raça Landrace (*Sus domesticus*) foram utilizadas para a realização do estudo clínico na espécie alvo, que ocorreu no setor de suinocultura da Fazenda Experimental prof. Hélio Barbosa (EV/UFMG). As matrizes foram alojadas em gaiolas individuais acimentadas, onde recebiam ração conforme a fase gestacional e água limpa *ad libidum*.

#### 1 4.3.2. Imunização e coleta sanguínea dos coelhos

Similarmente ao realizado em hamsters, foram estudados 5 grupos experimentais contendo 6 coelhos Nova Zelândia (1,5 – 2 kg) em cada. Os grupos foram compostos por (i) animais controle (não vacinado); (ii) tratamento AB1; (iii) tratamento AB2; (iv) tratamento Q1 e (v) tratamento Q2. Todos os grupos receberam 100 µg do adjuvante hidróxido de alumínio em três tempos de imunização subcutânea, intervalados por 14 dias. O grupo controle foi inoculado com solução salina estéril 0,85% (tabela 4.3.2.1).

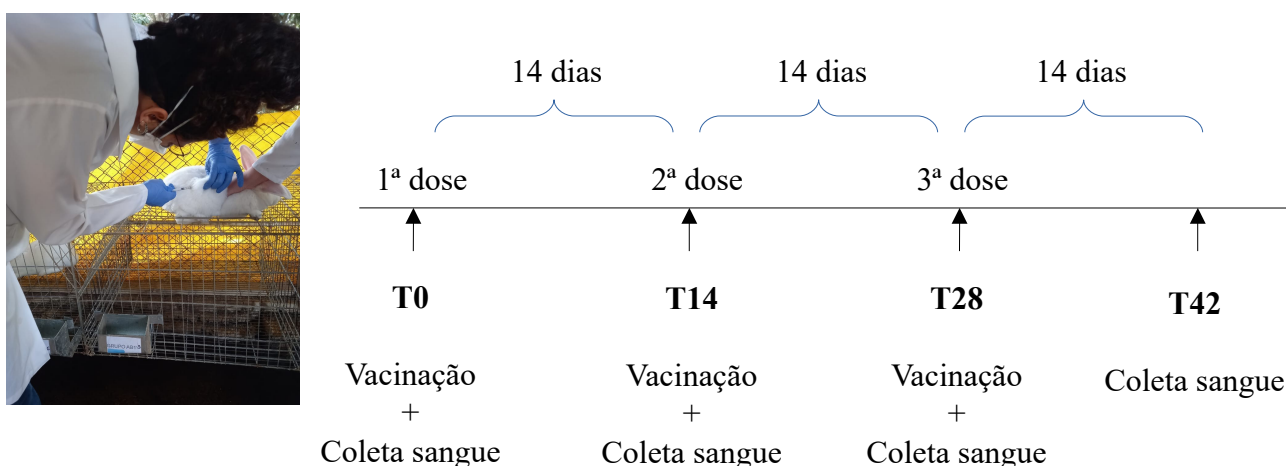
**Tabela 4.3.2.1.** Grupos de coelhos Nova Zelândia utilizados para avaliação da potência das vacinas recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*

<b>Grupo</b>	<b>Inóculo/imunizante</b>	<b>Dose</b>
Controle	Salina	0,85%
Tratamento AB1	Bivalente	10 µg
Tratamento AB2	Bivalente	50 µg
Tratamento Q1	Quimera	10 µg
Tratamento Q2	Quimera	50 µg

Anteriormente à cada vacinação, foi coletado sangue venoso de todos os animais a partir de ramificações da veia auricular, para retirada do soro e posterior titulação de



anticorpos anti-proteínas recombinantes. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sensibilizados e exsanguinados por secção das artérias carótidas e veias jugulares. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização (FAVORETTO; SEABRA; OLIVATO, 2019; SALVARANI et al., 2013) (Figura 4.3.2.1).

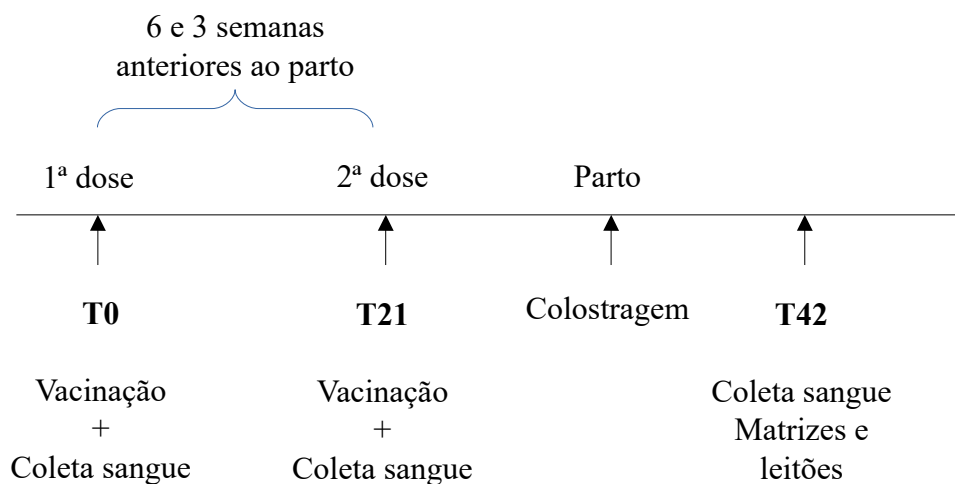


**Figura 4.3.2.1.** Representação esquemática da imunização e coleta sanguínea de coelhos da raça Nova Zelândia para avaliação da presença e títulos de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*

#### 1      4.3.3. Imunização ativa e passiva dos suínos

Para a imunização ativa das matrizes suínas, dose correspondente ao dobro da menor dose responsável pela geração de títulos de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile* nos coelhos foi utilizada, como será discutido adiante. Conforme cálculo amostral (CHARAN; KANTHARIA, 2013; SAMPAIO, IVAN BARBOSA MACHADO, 1998) o estudo foi composto por três grupos experimentais contendo 6 animais cada: (i) controle (salina estéril 0,85%); (ii) tratamento AB e (iii) tratamento Q. As matrizes foram imunizadas com duas doses às 6 e 3 semanas que antecederam o parto pela via intramuscular, em adição a  $100 \mu\text{g}$  de

hidróxido de alumínio (Figura 4.3.3.1). Anteriormente às inoculações, aproximadamente 10 mL do sangue de cada animal foi coletado pela veia jugular, para obtenção de soro (Figura 4.3.3.2) (ARTIUSHIN et al., 2013; SALVARANI et al., 2013).



**Figura 4.3.3.1.** Representação esquemática da imunização e coleta sanguínea de suínos imunizados para detecção e titulação de anticorpos anti-fragmentos recombinantes das toxinas A e B de *C. difficile*



**Figura 4.3.3.2.** Contenção de matrizes suínas Landrace prenhas submetidas a experimentação, com realização de coleta sanguínea pela veia jugular e imunização via intramuscular. Imagem obtida do setor de suinocultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG. Fonte: arquivo pessoal.

As matrizes tiveram os seus partos assistidos e os leitões conduzidos à 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 coleta sanguínea das veias cefálica e/ou jugular fossem realizadas (Figura 4.3.3.3). Nesse mesmo tempo, coleta sanguínea das matrizes foram também executadas, para obtenção do soro, detecção e titulação dos anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (SALVARANI et al., 2013; TIAN et al., 2012, 2017).



**Figura 4.3.3.3.** Coleta sanguínea pela veia jugular de leitão neonato aleatoriamente selecionado, parido de matriz imunizada com as vacinas Q, AB ou controle. Imagem obtida do setor de suinocultura da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG. Fonte: arquivo pessoal.

#### 1                    4.3.4. Padronização e execução dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) indireto

Para a padronização dos ensaios enzimáticos indiretos para a detecção das IgG anti-TcdA, anti-TcdB e anti-TcdAB de coelhos e suínos, uma curva de titulação foi realizada, para determinação da melhor massa antigênica e diluições dos soros e dos anticorpos conjugados (DHOM-LEMOS et al., 2019). Em triplicata, placas de 96 poços (Maxisorp, ThermoFisher, USA) foram sensibilizadas com 0,25 µg, 0,5 µg e 1,0 µg com cada uma das proteínas recombinantes sintetizadas *overnight* a 4°C (COHEN et al., 2014; YANG

et al., 2008). O bloqueio das placas foi realizado com 5% de albumina bovina (BSA) em PBS 1X.

Pool de soros de cada um dos grupos de coelhos, em seus respectivos tempos de coleta, foram diluídos a 1:50 e 1:100, enquanto pool de soros de suínos foram diluídos de 1:50 a 1:1600. Imunoglobulinas anti-IgG de coelhos conjugadas a peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídas 20.000 e 40.000 vezes e testadas, conforme recomendação do fabricante. Já as imunoglobulinas anti-IgG de suínos conjugadas a peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídas 10.000, 20.000 e 40.000 vezes, em BSA 2,5% e PBS 1X. A detecção dos anticorpos primários (pool de soros), através da revelação dos anticorpos conjugados (secundários), ocorreu com a adição de 0.05% de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e 0.1% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em tampão citrato (DHOM-LEMOS et al., 2019). A absorbância das placas foi mensurada utilizando leitor de ELISA automatizado (VersaMax, Molecular Devices, USA) a 492 nm. A definição das massas antigênicas que foram utilizadas nos testes, bem como diluição dos soros e anticorpos secundários, baseou-se na maior razão obtida entre pool de soros positivos (último tempo e pool de soro de leitões) e os soros negativos (controles) (PORTELA et al., 2019).

1

#### **4.4. Análises estatísticas**

As análises estatísticas e gráficos foram gerados com os programas InfoStat 2020 e GraphPad 9.0. A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos hamsters desafiados foi analisada pelo teste de Mantel-Cox (KISHORE; GOEL; KHANNA, 2010). A homoscedasticidade e normalidade dos dados referentes aos títulos de anticorpos de coelhos e suínos frente às proteínas recombinantes TcdA e TcdB foram avaliados com os testes F e Shapiro-Wilks, respectivamente (SAMPAIO, IVAN BARBOSA MACHADO, 1998). One-Way ANOVA e o pós-teste de Duncan foram empregados em

situações de distribuição normal dos dados. Na ausência de normalidade, mesmo após transformação logarítmica (PINO, 2014), dados de mais de dois grupos de animais e avaliando-se os diferentes tempos foram analisados com o teste de Friedman e pós-teste de Dunn. Ainda, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para a avaliação da diferença entre diferentes grupos de animais vacinados. Diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando valor de  $p \leq 0,05$  (SAMPAIO, IVAN BARBOSA MACHADO, 1998).

## 5. RESULTADOS

### 1 5.1. Seleção e análises *in silico* de potenciais alvos vacinais

Estudos anteriores evidenciaram que fragmentos em repetição na região C-terminal (CROP ou RBD) das toxinas A e B de *C. difficile*, estirpe de referência 10403 (ATCC 4325, CD630, RT087), apresentam elevada imunogenicidade e similaridade a nível de nucleotídeos e aminoácidos com estirpes de outros ribotipos (DINGLE et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2015; LI et al., 2020; GUPTA et al., 2017; HERNANDEZ et al., 2017; HO et al., 2005; ORTH et al., 2014). Tais fragmentos foram selecionados e submetidos análises *in silico* para posterior síntese plasmideal e preparo para clonagem e expressão em *E. coli*. Está demonstrado na figura 5.1.1 parte das sequências de aminoácidos da região CROP das toxinas A e B de *C. difficile* que foram submetidas ao programa Bepipred, para verificação da probabilidade de existência de epítomos para células B.

a)

Entry	Exposed/Buried	RelativeSurface	HelixProbability	SheetProbability	CoilProbability	EpitopeProbability
TcdA	B	0,148	0,003	0,718	0,279	0,485666666667
TcdA	E	0,533	0,005	0,336	0,66	0,496666666667
TcdA	E	0,653	0,004	0,085	0,91	0,521111111111
TcdA	E	0,533	0,004	0,138	0,858	0,520777777778
TcdA	E	0,473	0,004	0,138	0,858	0,526111111111
TcdA	E	0,3	0,004	0,514	0,481	0,527888888889
TcdA	E	0,299	0,002	0,816	0,182	0,519555555556
TcdA	E	0,331	0,002	0,816	0,182	0,505
TcdA	E	0,319	0,003	0,718	0,279	0,492
TcdA	E	0,413	0,004	0,514	0,481	0,491666666667
TcdA	E	0,35	0,004	0,616	0,381	0,494
TcdA	B	0,264	0,003	0,718	0,279	0,493555555556
TcdA	B	0,219	0,002	0,816	0,182	0,501666666667
TcdA	E	0,472	0,004	0,616	0,381	0,513777777778
TcdA	E	0,475	0,005	0,262	0,733	0,514111111111
TcdA	E	0,587	0,004	0,138	0,858	0,507111111111
TcdA	E	0,513	0,004	0,197	0,799	0,511444444444
TcdA	B	0,21	0,003	0,718	0,279	0,514555555556
TcdA	B	0,157	0,001	0,9	0,099	0,502333333333
TcdA	B	0,126	0,001	0,9	0,099	0,507888888889
TcdA	B	0,124	0,001	0,9	0,099	0,500222222222
TcdA	B	0,193	0,002	0,816	0,182	0,494111111111
TcdA	B	0,227	0,003	0,718	0,279	0,494666666667
TcdA	E	0,542	0,004	0,197	0,799	0,494777777778
TcdA	E	0,704	0,005	0,045	0,951	0,507777777778
TcdA	E	0,476	0,004	0,138	0,858	0,513333333333
TcdA	E	0,346	0,004	0,42	0,576	0,527444444444
TcdA	B	0,256	0,004	0,616	0,381	0,536555555556
TcdA	B	0,254	0,003	0,718	0,279	0,532555555556
TcdA	B	0,27	0,002	0,816	0,182	0,539
TcdA	E	0,331	0,002	0,816	0,182	0,550666666667
TcdA	E	0,34	0,003	0,718	0,279	0,557777777778
TcdA	E	0,493	0,004	0,514	0,481	0,569444444444
TcdA	E	0,399	0,005	0,336	0,66	0,573555555556
TcdA	E	0,581	0,02	0,205	0,775	0,575888888889
TcdA	E	0,55	0,02	0,205	0,775	0,574111111111
TcdA	E	0,375	0,004	0,42	0,576	0,569555555556
TcdA	E	0,324	0,004	0,616	0,381	0,566111111111
TcdA	B	0,299	0,004	0,616	0,381	0,557777777778
TcdA	E	0,393	0,004	0,514	0,481	0,548888888889
TcdA	E	0,324	0,004	0,42	0,576	0,544555555556
TcdA	E	0,316	0,003	0,718	0,279	0,536333333333
TcdA	B	0,212	0,001	0,959	0,04	0,528888888889
TcdA	E	0,348	0,001	0,959	0,04	0,516333333333
TcdA	E	0,31	0,001	0,959	0,04	0,506333333333
TcdA	E	0,433	0,003	0,718	0,279	0,495666666667
TcdA	E	0,7	0,005	0,045	0,951	0,482333333333
TcdA	E	0,586	0,005	0,015	0,979	0,471666666667

b)

Entry	Exposed/Buried	RelativeSurface	HelixProbability	SheetProbability	CoilProbability	EpitopeProbability
TcdB	B	0,125	0,002	0,816	0,182	0,503333333333
TcdB	B	0,136	0,001	0,959	0,04	0,546555555556
TcdB	B	0,114	0	0,983	0,017	0,6
TcdB	E	0,297	0,001	0,959	0,04	0,611444444444
TcdB	E	0,336	0,002	0,816	0,182	0,652
TcdB	E	0,755	0,004	0,085	0,91	0,628222222222
TcdB	E	0,697	0,005	0,015	0,979	0,636888888889
TcdB	E	0,386	0,004	0,514	0,481	0,638666666667
TcdB	E	0,269	0,001	0,9	0,099	0,609333333333
TcdB	B	0,114	0,001	0,9	0,099	0,591222222222
TcdB	B	0,146	0,011	0,918	0,071	0,562777777778
TcdB	B	0,133	0,002	0,816	0,182	0,515777777778
TcdB	E	0,286	0,004	0,616	0,381	0,513444444444
TcdB	E	0,439	0,004	0,197	0,799	0,479666666667
TcdB	E	0,678	0,018	0,047	0,935	0,517111111111
TcdB	E	0,545	0,019	0,141	0,84	0,524666666667
TcdB	E	0,373	0,021	0,279	0,699	0,541555555556
TcdB	B	0,237	0,021	0,451	0,528	0,554222222222
TcdB	B	0,235	0,023	0,655	0,322	0,546777777778
TcdB	B	0,246	0,021	0,756	0,223	0,541111111111
TcdB	B	0,267	0,018	0,846	0,136	0,565888888889
TcdB	E	0,367	0,004	0,616	0,381	0,559222222222
TcdB	E	0,418	0,005	0,336	0,66	0,563666666667
TcdB	E	0,502	0,005	0,262	0,733	0,559888888889
TcdB	E	0,477	0,005	0,262	0,733	0,550777777778
TcdB	E	0,272	0,004	0,616	0,381	0,548111111111
TcdB	E	0,272	0,003	0,718	0,279	0,530444444444
TcdB	B	0,21	0,003	0,718	0,279	0,523333333333
TcdB	E	0,341	0,004	0,616	0,381	0,516888888889
TcdB	E	0,329	0,004	0,42	0,576	0,503888888889
TcdB	B	0,267	0,004	0,42	0,576	0,507333333333
TcdB	B	0,221	0,002	0,816	0,182	0,496
TcdB	E	0,308	0,001	0,959	0,04	0,468888888889
TcdB	E	0,352	0,001	0,9	0,099	0,46
TcdB	E	0,382	0,003	0,718	0,279	0,448444444444
TcdB	E	0,653	0,004	0,138	0,858	0,433666666667
TcdB	E	0,611	0,005	0,045	0,951	0,399777777778
TcdB	E	0,313	0,004	0,514	0,481	0,387
TcdB	B	0,155	0,002	0,816	0,182	0,416111111111
TcdB	B	0,083	0,001	0,9	0,099	0,427555555556
TcdB	B	0,067	0,011	0,918	0,071	0,465444444444
TcdB	B	0,075	0,001	0,9	0,099	0,470666666667
TcdB	B	0,196	0,004	0,616	0,381	0,512888888889
TcdB	E	0,568	0,004	0,197	0,799	0,553111111111

**Figura 5.1.1.** Apresentação parcial das sequências de aminoácidos das toxinas A (a) e B (b) submetidas a análise de predição de epítomos para linfócitos B no programa Bepipred 2.0 (CBS, DEN). Regiões com maior probabilidade de antigenicidade ( $\geq 0,5$ ) estão marcadas em vermelho.

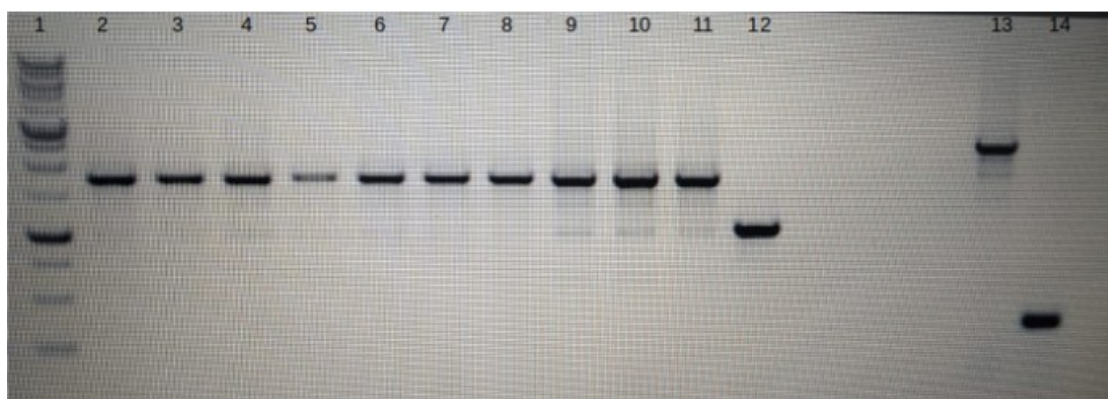
Em conformidade com os resultados vistos em trabalhos anteriores, regiões possivelmente antigênicas para células B foram identificadas com as análises realizadas no Bepipred. A realização da etapa de otimização de 100% das sequências de nucleotídeos resultou na obtenção de códons que melhor expressam as sequências de aminoácidos de *C. difficile* em *E. coli*, sendo um processo de extrema importância para que a síntese proteica seja adaptada ao sistema utilizado. A otimização dos códons foi seguido de conferência dos aminoácidos sintetizados, através do software GCUA 2.0.



Foi observado pelo software MAFFT que as sequências de aminoácidos traduzidos por *E. coli* são idênticas às sintetizados por *C. difficile*. Os sítios de restrição presentes e ausentes nas sequências de nucleotídeos dos fragmentos de TcdA e TcdB foram descritos pelo programa Restriction Analyzer, a partir do qual foram selecionadas sequências contendo os sítios para NdeI, NheI, HindIII e XhoI, que compuseram, juntamente à sequência de nucleotídeos otimizados, os genes sintéticos presentes no vetor de clonagem pUC57.

Realizada a digestão do vetor de clonagem pUC57, purificação do DNA e inserção das sequências TcdAB (quimera), TcdA e TcdB aos vetores de expressão pET28a-TEV, foi realizada a transformação dos respectivos plasmídeos em estirpes Arctic Express (DE3) e BL21 Star eletrocompetentes.

Clones de Arctic Express e BL21 transformados foram cultivados em ágar 2xYT contendo kanamicina e selecionados para a confirmação da presença dos insertos quimera, TcdA e TcdB. Conforme mencionado anteriormente, a confirmação ocorreu por PCR da região flanqueadora T7, para observação dos respectivos pesos moleculares em gel de agarose. A figura 5.1.2 ilustra o gel de agarose dos produtos de cada um dos clones amplificados por PCR da região T7.

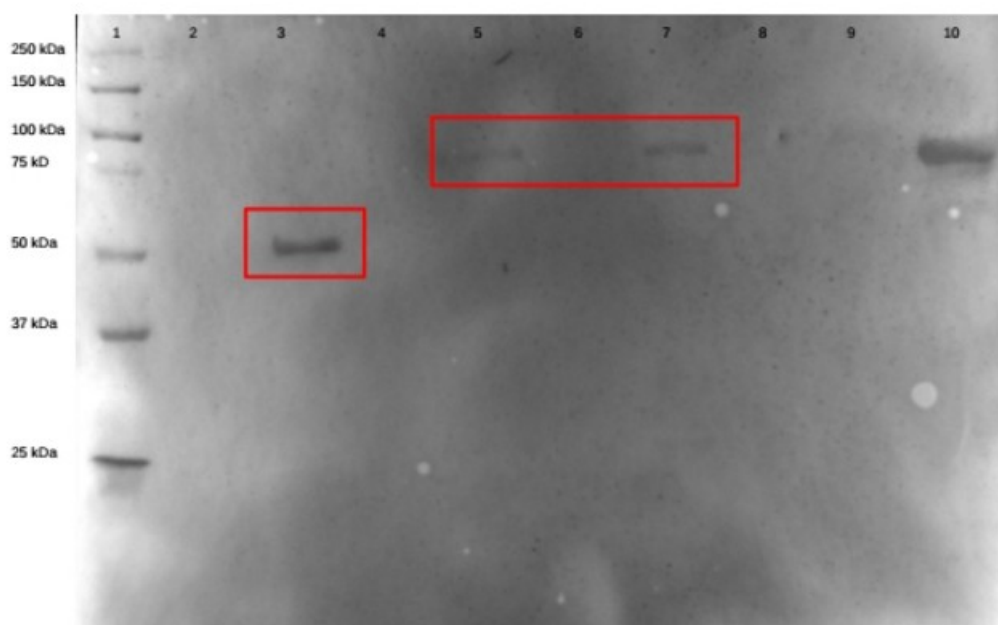


**Figura 5.1.2.** Gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos *primers* T7 *forward* e T7 *reverse* de clones de BL21Star selecionados em meio 2xYT com kanamicina. Canaleta 1: 1kb DNA ladder (Kasvi, BRA); canaletas 2 a 11: amplicons de clones com peso molecular sugestivos de TcdA (1500pb); canaleta 12: sugestivo de TcdB (800pb); canaleta 13: sugestivo de TcdA+TcdB (quimera) (2300pb); canaleta 14: controle negativo (ausência de inserto).

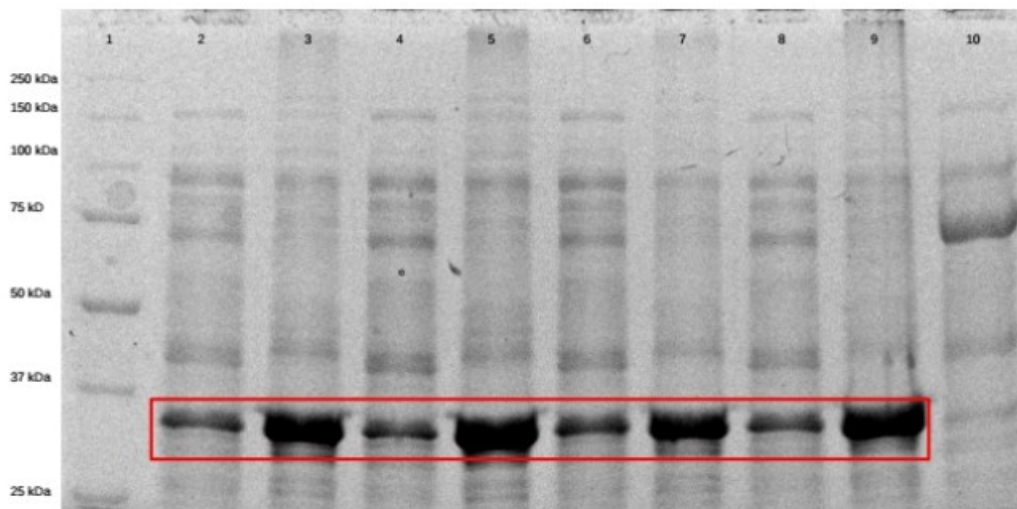
## 1 5.2. Produção e caracterização das vacinas recombinantes

Testes de expressão das proteínas recombinantes em clones dos hospedeiros *E. coli* Arctic Express (DE3) e BL21Star foram realizados. Conforme os resultados, a expressão de TcdB em sua fração solúvel foi observado em BL21, hospedeiro de expressão comumente utilizado em escalas industriais (PACHECO et al., 2012). Já a proteína quimérica TcdAB, bem como TcdA, foram expressas em sua fração solúvel apenas em Arctic Express. Na figura 5.2.1 estão demonstrados gel de SDS 10% e membrana de Western Blotting de cada uma das proteínas sintetizadas.

a)



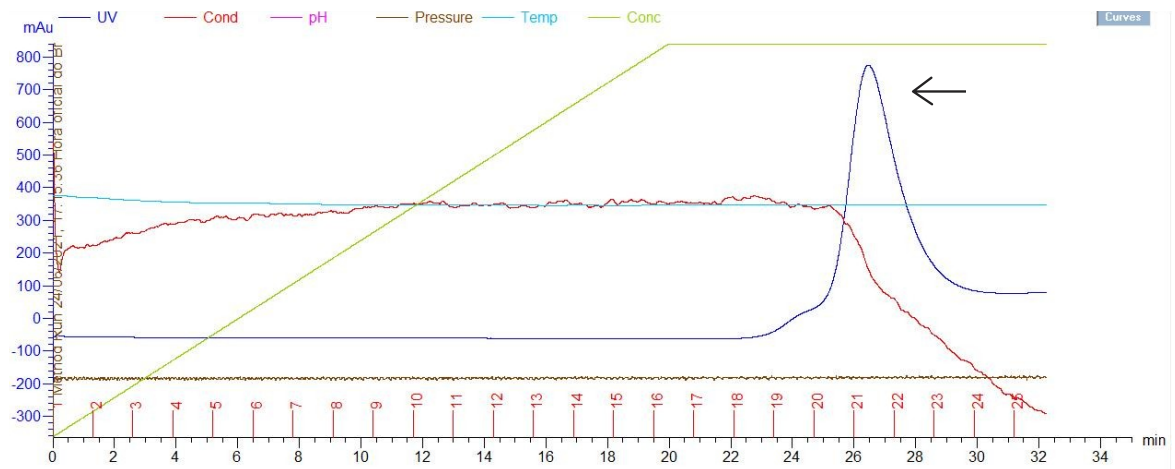
b)



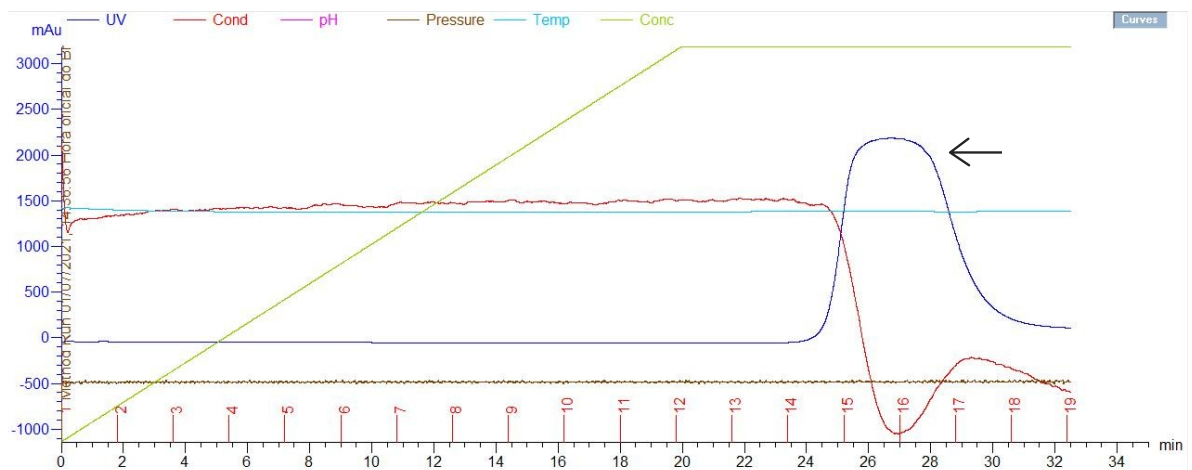
**Figura 5.2.1.** a) Western blotting das proteínas recombinantes produzidas por Arctic Express após revelação de anticorpo conjugado anti-Histidina. Canaleta 1: Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (10 – 250 kD) (Bio-rad, USA); canaleta 3: TcdA (57 kDa); canaletas 5 e 7: TcdA+TcdB (quimera, 89 kDa); canaleta 10: controle positivo (75 kDa). b) Gel SDS 10% das proteínas produzidas por BL21 Canaleta 1: Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (10 – 250 kD) (Bio-rad, USA); canaletas 2 a 9: proteínas TcdB (32 kDa) destacadas em vermelho; canaleta 10: controle positivo (75 kDa, proteína KDDR).

Uma elevada taxa de recuperação das proteínas foi observada através de cromatograma gerado pelo sistema AKTApriime plus durante o processo de purificação, (Figura 5.2.2), bem como pela quantificação utilizando o kit BCA *protein assay*. Nesse sentido, rendimentos de aproximadamente 2,546 mg de TcdAB (quimera), 29,652 mg de TcdA e 3,309 mg de TcdB para cada litro de inóculo bacteriano foram obtidos.

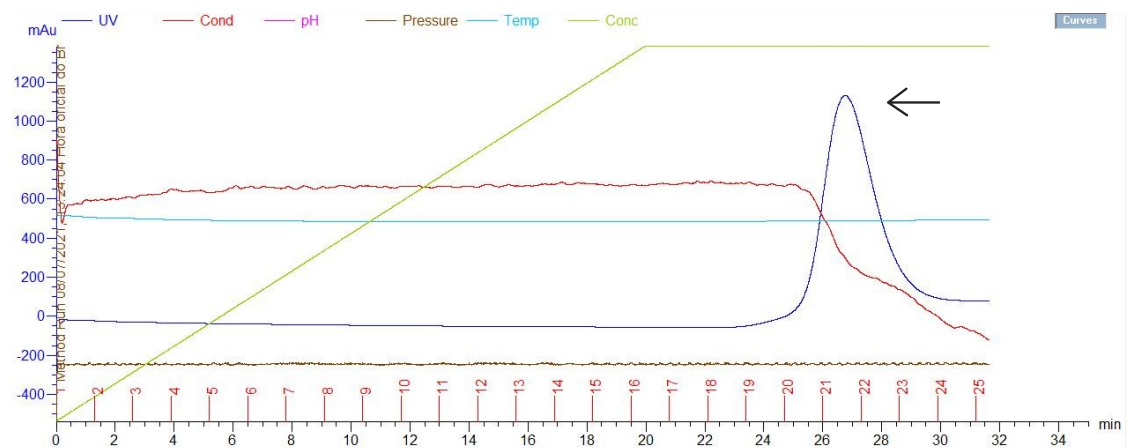
a)



b)



c)



**Figura 5.2.2** Perfil cromatográfico obtido na purificação das proteínas recombinantes TcdAB (5.2 a) TcdA (5.2 b) e TcdB (5.2 c). As proteínas purificadas estão demonstradas em azul, com setas apontando os picos da recuperação proteica. Os picos ocorrem minutos após a injeção da concentração máxima de solução eluente contendo imidazol, representada em amarelo.

Além de elevado rendimento, as proteínas sintetizadas apresentaram esterilidade aos testes em aerobiose e anaerobiose, bem como inocuidade em  $6,0 \times 10^4$ /poço de células Vero em até 25  $\mu\text{g}$  de TcdAB e 50  $\mu\text{g}$  de TcdB e TcdA após 72 horas de incubação. Como será descrito adiante, os animais que receberam estas vacinas não apresentaram alterações clínicas nos primeiros 7 dias após as inoculações, atestando a inocuidade das vacinas em modelos animais.

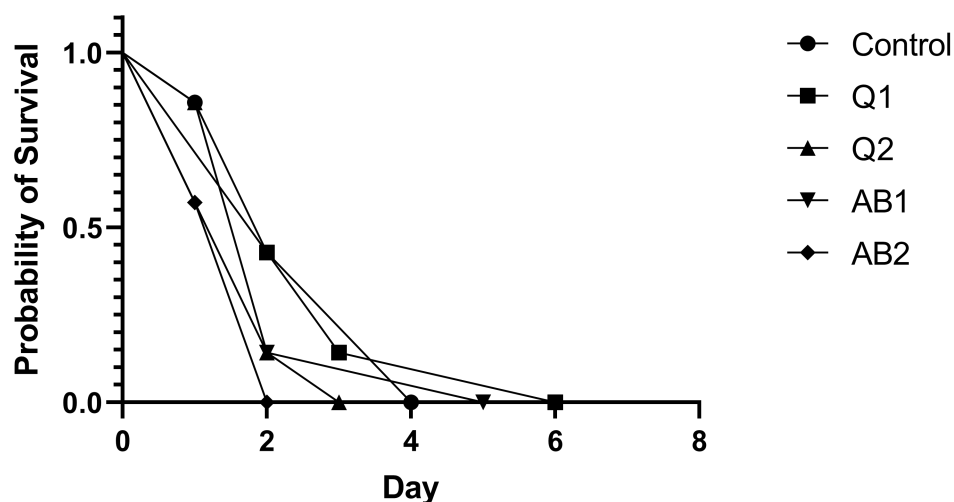
## 1            **5.3. Testes pré-clínicos**

### 2            *5.3.1 Análise de potência em hamster sírio*

Todos os hamsters permaneceram saudáveis e sem alterações clínicas após as três doses de imunizantes até o seu desafio, demonstrando a inocuidade das vacinas recombinantes em modelos animais. Os animais permaneceram saudáveis, ainda, até o momento do desafio, inclusive os de grupo controle e 24 h após a sensibilização, o que demonstrou a provável ausência do agente no ambiente e consequente ausência de infecção dos animais anteriormente à gavagem.

Realizado o procedimento de indução a infecção dos animais com  $8 \times 10^6$  esporos em solução salina, alguns animais apresentaram sinais clínicos relacionados a ICD, como diarreia aquosa (vista principalmente por sujidades indicativas na cauda), em aproximadamente 36 horas após a indução. Com evolução para apatia, anorexia e postura curva, com ou sem ocorrência de diarreia, tais sinais foram inicialmente vistos

em animais dos grupos controle, AB1, AB2 e Q2. Dois dias após a infecção, os sinais já eram observados em animais de todos os grupos, havendo nesse período a morte natural ou eutanásia de aproximadamente 68% dos hamsters. Cinco dias após a infecção, todos os animais já haviam sucumbido à doença (Figura 5.3.1).



**Figura 5.3.1** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de diferentes grupos de hamsters sírios controle (C) e imunizados com as vacinas bivalente contendo 10 $\mu$ g (AB1) e 50  $\mu$ g (AB2) e quimera com 10 e 50  $\mu$ g (Q1 e Q2, respectivamente), desafiados por *C. difficile* (RT 014/020) e observados durante 8 dias. O teste de Mantel-Cox não apontou diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência dos diferentes grupos avaliados ( $p \geq 0,05$ ).

Além dos sinais clínicos sugestivos de infecção por *C. difficile*, lesões macroscópicas características da infecção em hamsters (KEEL; SONGER, 2006; SILVA et al., 2014a) foram também observadas à necropsia, conforme ilustrado na figura 5.3.2.



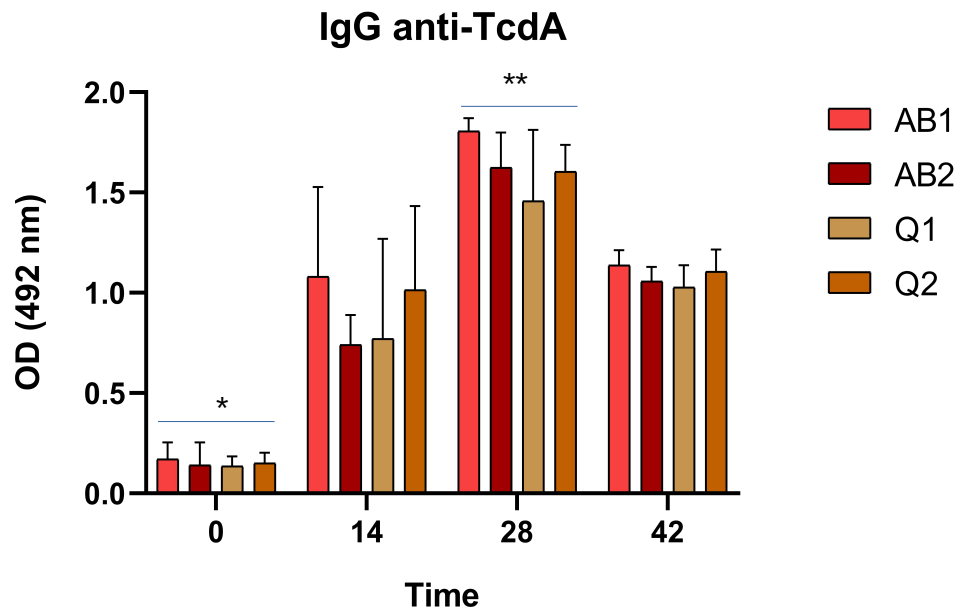
**Figura 5.3.2.** Hamster sírio desafiado por *C. difficile* e eutanasiado. Cavidade abdominal de hamster desafiado por *C. difficile*. Alças cecais tumefeitas com serosa difusamente hemorrágica. Foi observado líquido serosanguinolento no lúmen, sugestivo de tiflíte hemorrágica. Fonte: arquivo pessoal

### 1 5.3.2. Análise de resposta imune humoral em coelhos Nova Zelândia

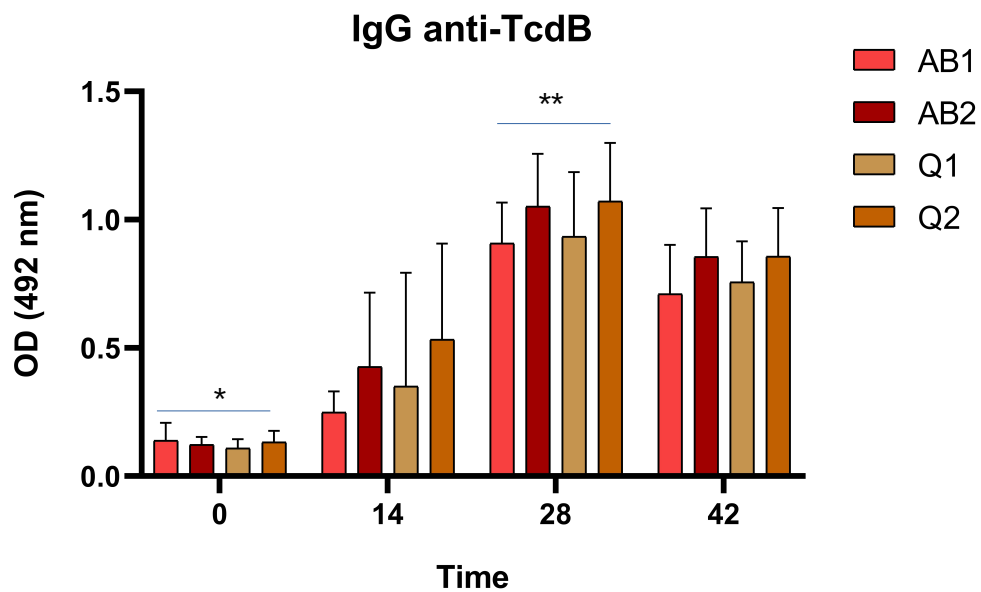
Todos os coelhos amostrados permaneceram saudáveis, sem alterações clínicas após as três doses de imunizantes, até a finalização do experimento. Dado a discrepância dos dados de absorvância entre os diferentes grupos amostrados, mesmo após transformação logarítmica, as análises estatísticas foram realizadas com o teste de Friedman (dados pareados) ou Kruskal-Wallis, análises não-paramétricas alternativas à ANOVA. Todos os grupos de animais imunizados com as vacinas recombinantes bivalente e quimérica, no tempo 0 (dia da primeira inoculação), apresentaram absorvância estatisticamente igual aos quatro tempos analisados do grupo controle (salina + hidróxido de alumínio).

Ainda com relação aos tempos de imunização, ao analisar-se os soros dos animais frente ao antígeno A e B, não foram observadas diferenças entre os tempos 14 e 42 (14 dias após a primeira e terceira doses, respectivamente) Figura 5.3.2.1.

a)



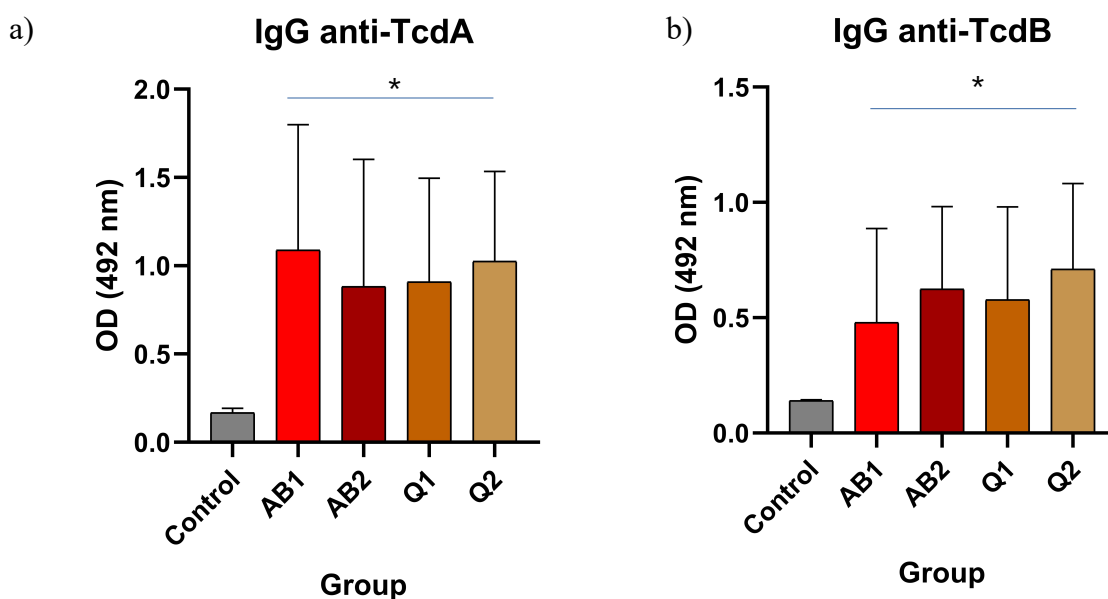
b)





**Figura 5.3.2.1.** Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de coelhos imunizados com as vacinas bivalente contendo 10 $\mu$ g (AB1) e 50  $\mu$ g (AB2) e quimera com 10 e 50  $\mu$ g (Q1 e Q2, respectivamente) nos tempos 0, 14, 28 e 42 avaliados por ELISA indireto. Dados de absorbância demonstrados em medianas e CI95%. \* Diferenças significativas entre diferentes tempos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Friedman.

Em relação à composição dos imunógenos, não foram observadas diferenças significativas entre as vacinas recombinantes bivalente e quimérica, tampouco entre as diferentes doses administradas (10 e 50  $\mu$ g), conforme demonstrado nas figuras 5.3.2.2.



**Figura 5.3.2.2.** Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de coelhos controle e imunizados com as vacinas bivalente contendo 10 $\mu$ g (AB1) e 50  $\mu$ g (AB2) e quimera com 10 e 50  $\mu$ g (Q1 e Q2, respectivamente) avaliados por ELISA indireto. As barras presentes no eixo X representam dados obtidos dos tempos 0, 14, 28 e 42. Dados de absorbância demonstrados em medianas e CI95%. \* Diferenças significativas entre grupos vacinados AB e Q nas doses de 10 e 50  $\mu$ g ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

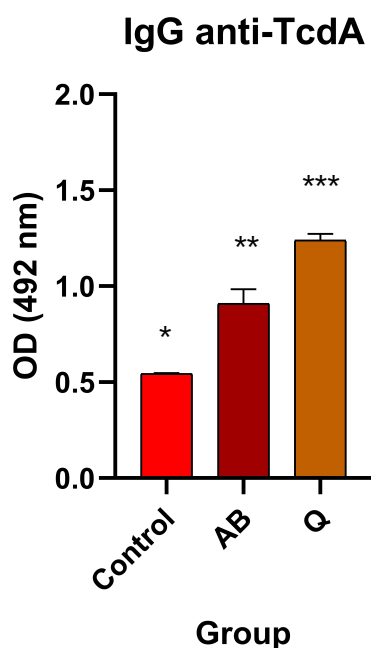
#### 1                    **5.4. Testes clínicos em suínos e análise da imunização passiva**

Similarmente ao observado nos coelhos, todas as matrizes suínas amostradas permaneceram saudáveis, sem alterações clínicas após as duas doses dos imunizantes bivalente AB, quimera e grupos controle em adição ao hidróxido de alumínio.

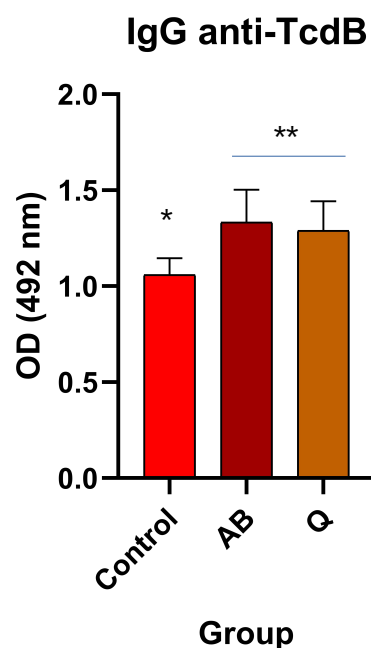
As análises dos dados referentes à resposta imune das matrizes e leitões neonatos contra a proteína recombinante TcdA por ELISA indireto ocorreu com o teste de Kruskal-Wallis. O mesmo ocorreu com dados gerados após análises utilizando a proteína TcdB, com exceção dos títulos de anticorpos em soro obtido das matrizes, que apresentaram distribuição normal e foram analisados por ANOVA seguido de pós teste de Duncan ( $CV = 29,7\%$ ).

Conforme o gráfico ilustrado na figura 5.4.1.a), composto pela absorbância no soro das matrizes imunizadas com as vacinas recombinantes bivalente (AB) e quimera (Q) em todos os tempos (0, 21 e 42), foram observados títulos de anticorpos estatisticamente diferentes entre todos os grupos frente ao antígeno TcdA, com o grupo controle apresentando absorbância inferior aos grupos vacinados e matrizes imunizadas com a vacina quimérica apresentando maiores títulos de anticorpos se comparadas às matrizes imunizadas com AB. Por outro lado, matrizes inoculadas com ambos imunizantes AB e Q apresentaram títulos de anticorpos similares e estatisticamente superiores ao grupo controle frente ao antígeno TcdB (Figura 5.4.1.b).

a)



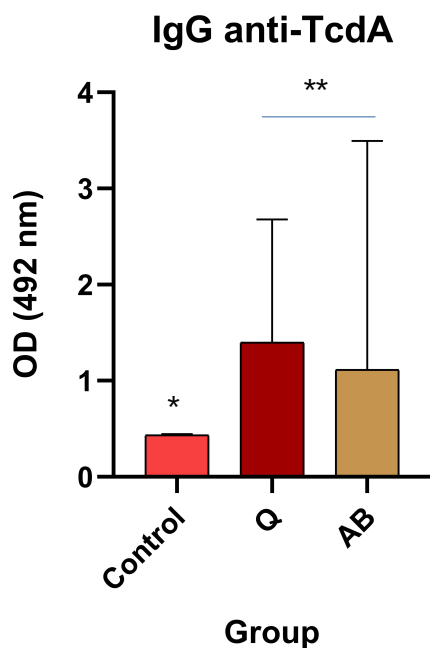
b)



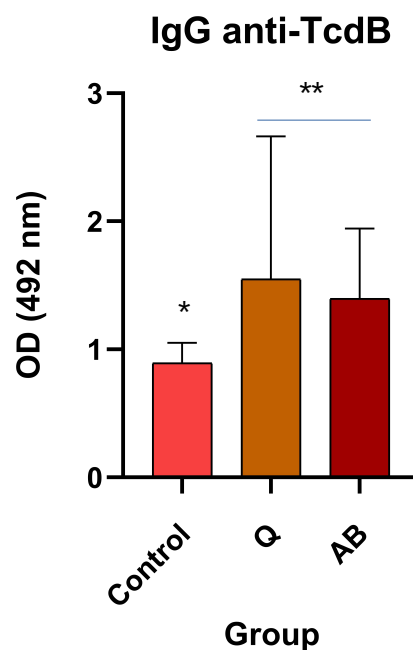
**Figura 5.4.1.** Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de matrizes suínas controle e imunizadas com as vacinas bivalente (AB) e quimera (Q) avaliados por ELISA indireto. As barras presentes no eixo X representam dados obtidos dos tempos 0, 21 e 42. \* Diferenças significativas entre diferentes grupos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis (dados demonstrados em medianas e CI95%) (figura 5.4.1.a) ou ANOVA (dados demonstrados em médias  $\pm$  SD (figura 5.4.1.b).

Em contraste com os resultados observados nas matrizes suínas, os leitões passivamente imunizados contra das 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 (Figura 5.4.2).

a)



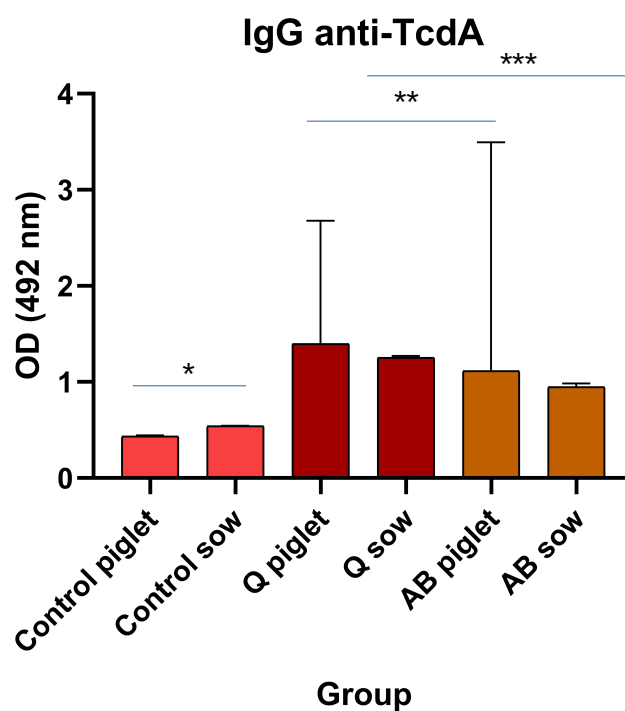
b)



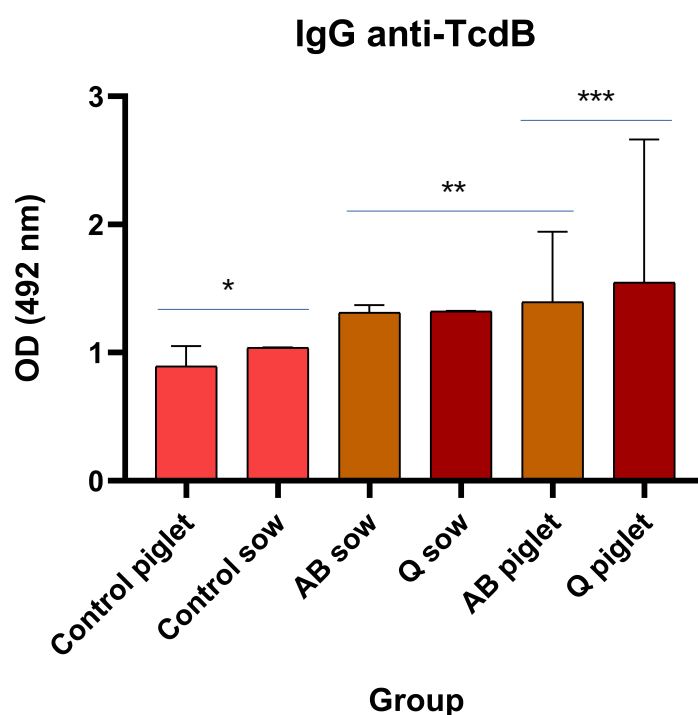
**Figura 5.4.2.** Absorbância (OD 492 nm) de IgG anti-TcdA (a) e anti-TcdB recombinantes (b) dos grupos de leitões controle e imunizados com as vacinas bivalente (AB) e quimera (Q) avaliados por ELISA indireto. Dados demonstrados em medianas e CI95%. \* Diferenças significativas entre diferentes grupos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Foi realizado, ainda, análises em que foram comparados os títulos de anticorpos detectados nas matrizes suínas nos tempos 21 e 42 e nos leitões neonatos. Similarmente a análises anteriores, os animais dos grupos controle apresentaram títulos de anticorpos inferiores aos demais grupos frente aos antígenos recombinantes A e B (Figura 5.4.3). Apesar de valores de absorbâncias estatisticamente similares entre soros de leitões e matrizes vacinadas com Q e AB, o que se observa descritivamente é um maior título de IgG anti-TcdA e anti-TcdB em leitões passivamente imunizados com a vacina quimérica se comparado à resposta induzida por AB, similar ao observado nas análises anteriores.

a)



b)



**Figura 5.4.3.** 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 quimera (Q) avaliados por ELISA indireto. As barras presentes no eixo X representam dados obtidos de matrizes nos tempos 21, 42 e leitões neonatos.

Dados demonstrados em medianas e CI95%. \* Diferenças significativas entre diferentes grupos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

## 6. DISCUSSÃO

Por ser um microrganismo formador de esporos que pode se disseminar e perpetuar no ambiente por longos períodos, a prevenção da infecção por *C. difficile* deve ocorrer, idealmente, por métodos imunoprolifáticos (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012). A imunização passiva de leitões neonatos para a prevenção da ICD se faz necessária, ainda, pela maior susceptibilidade deste hospedeiro à infecção, dada a sua microbiota imatura (KEEL; SONGER, 2006). É demonstrado que a presença de imunoglobulinas anti-TcdA e anti-TcdB sistêmicas, bem como presentes no lúmen intestinal de suínos, podem ser capazes de promover a neutralização das toxinas A e B (SILVA; COHEN et al., 2014; STEELE et al., 2013; TIAN et al., 2017) e conseqüentemente reduzindo as perdas produtivas causadas pelo agente na produção suinícola.

A utilização de *E. coli* como sistema para produção de proteínas recombinantes é amplamente difundida nos meios acadêmico e industrial (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; PACHECO et al., 2012). A rápida taxa de replicação do agente, adicionalmente a sua elevada produtividade e potencial alto rendimento de produção proteica em um curto espaço de tempo e a baixos custos associados à sua manutenção torna esse sistema altamente vantajoso, motivo pelo qual foi optada a sua utilização para a produção das vacinas recombinantes no presente estudo (CID; BOLÍVAR, 2021; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007).

Ao analisarem as sequências nucleotídicas de TcdA e TcdB, Li e colaboradores (2020) relataram identidades que variam de 98% a 99,1% entre sequências completas de TcdA e variação de 86,1% a 99,1% entre TcdB de diversos ribotipos de relevância clínica analisados, como RT014/020, RT126, RT078 e RT027. Os autores ressaltam que a maior variabilidade identificada em TcdB concentra-se em seus domínios enzimáticos,

situados na porção central da toxina. Interessantemente, toxinas A e B de estirpes do ribotipo RT014/020, comumente isoladas em suínos no Brasil, apresentaram elevada identidade com a cepa CD630 (99,7%) (LI et al., 2020).

Dada a neutralização por anticorpos que se ligam à região C-terminal em testes utilizando toxinas A e B da estirpe CD630, bem como a demonstrada reatividade cruzada dessas toxinas entre cepas de diversos ribotipos (HERNANDEZ et al., 2015), foram selecionados para a execução do presente estudo sequências C-terminais de aminoácidos da referida estirpe (BABCOCK et al., 2006; COHEN et al., 2014; HUSSACK et al., 2011; LI et al., 2020; ORTH et al., 2014; TIAN et al., 2012, 2017).

Conforme demonstrado, os resultados de predição de epitopos em células B das sequencias analisadas corroboraram os dados previamente publicados, em que são descritos a antigenicidade e imunogenicidade dos fragmentos CROP, capazes de induzir a produção de resposta imune protetora em roedores (BABCOCK et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2017; MAYNARD-SMITH et al., 2014; TIAN et al., 2017).

A otimização de 100% dos códons e expressão proteica em BL21 e Arctic Express possibilitou a aquisição de grandes massas proteicas já expressas em sua fração solúvel, otimizando o processo de produção, haja visto que a formação de corpos de inclusão insolúveis resultariam a necessidade de etapas solubilização e conseqüente menor rendimento proteico final (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). A formação de agregados insolúveis geralmente são conseqüência do enovelamento incorreto ou parcial das proteínas (FEIGE et al., 2008; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018), que pode ser gerado pela maior complexidade proteica, por elevadas taxas de expressão em um curto espaço de tempo ou mesmo a natureza hidrofóbica das proteínas (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; VALLEJO; RINAS, 2004). Conforme explorado anteriormente, a co-expressão de chaperoninas por Arctic Express atuam auxiliando em um correto enovelamento



proteico, através de sua ligação transiente aos domínios hidrofóbicos presentes na sequência, com prevenção a formação dos agregados insolúveis (GOTTESMAN; WICKNER; MAURIZI, 1997; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; ROZEMA; GELLMAN, 1995).

A utilização de *E. coli* é também vantajosa no presente estudo por se tratar da expressão de fragmentos proteicos bacterianos, compatibilidade entre hospedeiro e produto que também podem ter influenciado na elevada massa antigênica solúvel produzida (CID; BOLÍVAR, 2021; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007). Como consequência, obteve-se um produto altamente rentável, cujos custos associados à manutenção do sistema de produção são considerados baixos. A engenharia genética e produção de proteínas recombinantes utilizando sistemas heterólogos mostra-se uma ferramenta cada vez mais eficaz para a geração de compostos antigênicos rapidamente e em amplas quantidades (CID; BOLÍVAR, 2021). Se tratando de toxinas de *C. difficile*, esse sistema pode ser considerado ainda mais vantajoso, uma vez que a síntese de TcdA e TcdB nativos apresenta inúmeras limitações, tais como o baixo rendimento, processo de purificação dispendioso e muitas vezes ineficaz, bem como o risco relacionado à manipulação do agente e suas toxinas ativas (DONALD et al., 2013; KARCZEWSKI et al., 2014; WANG et al., 2012; YANG et al., 2008).

Sabe-se da elevada sensibilidade clínica do ensaio de toxicidade em células, especialmente da linhagem celular Vero, que é também altamente susceptível às toxinas A e B de *C. difficile* (KUEHNE et al., 2010). O padrão de citotoxicidade causado pelas frações enzimáticas de TcdA e TcdB é caracterizado pelo efeito de arredondamento celular, em decorrência das lesões provocadas no citoesqueleto e consequente perda de sua morfologia (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; KEEL; SONGER, 2011). Como descrito, esse padrão não foi observado no ensaio de inocuidade em células Vero,

tampouco foi observado o efeito citotóxico sobre os hospedeiros de expressão proteica (*E. coli*), que foram capazes de sintetizar elevadas concentrações das proteínas. Dessa forma, mesmo a proteína recombinante quimérica tendo apresentado efeito citotóxico com 50 µg de massa antigênica, optou-se pela realização dos ensaios em hamsters e coelhos com a utilização dessa como dose máxima, em conformidade com o empregado em ensaios anteriores (DONALD et al., 2013; SECORE et al., 2017; TIAN et al., 2012, 2017; WANG et al., 2012).

A infecção por *C. difficile* em hamsters é comumente fulminante, com ocorrência de quadro hiperagudo da infecção que pode resultar em morte dos animais mesmo antes da ocorrência de alterações clínicas (BEST; FREEMAN; WILCOX, 2012; KEEL; SONGER, 2006), similarmente ao observado no presente estudo. A escolha pela utilização de hamster sírio como modelo para a infecção por *C. difficile* é classicamente realizada para estudos de patofisiologia e virulência da cepa, em função da elevada susceptibilidade do hospedeiro à ICD se comparado a outras espécies animais (BEST; FREEMAN; WILCOX, 2012; BRUXELLE; PÉCHINÉ; COLLIGNON, 2018; KEEL; SONGER, 2006; SILVA et al., 2014a).

Trabalhos relatam a possibilidade de infecção de hamsters pelo agente mesmo com a inoculação de pequenas dosagens de antimicrobianos, como clindamicina, ampicilina, cefuroxima e fluoroquinolonas (BEST; FREEMAN; WILCOX, 2012; KEEL; SONGER, 2006; LARSON; BORRIELLO, 1990), sendo  $10^2$  UFC de *C. difficile* o suficiente para indução de doença fatal nessa espécie (KARCZEWSKI et al., 2014; ROBERTS et al., 2012; SECORE et al., 2017; SILVA et al., 2014a; TIAN et al., 2017; WANG et al., 2012). Nesse sentido, a elevada dose infectante utilizada no presente estudo ( $8 \times 10^6$ ) e possível elevada produção de toxinas pode ter contribuído com a elevada mortalidade e em curto espaço de tempo, sendo uma possível proteção

conferida pelas vacinas recombinantes químera (Q) e bivalente (AB) insuficientes nesse modelo, o que também já foi relatado e sugerido anteriormente (WANG et al., 2015).

Tamanha susceptibilidade torna o emprego de ensaios clínicos utilizando hamsters um desafio, sendo necessária a conferência de elevada resposta imune protetora para que os animais não desenvolvam a doença. Por outro lado, a ausência de proteção nessa espécie animal não necessariamente significa que outras espécies, menos susceptíveis ao agente, não se tornem protegida com o emprego das vacinas dentro dos esquemas previstos. É o caso, por exemplo, de hospedeiros como camundongos, coelhos, suínos ou mesmo seres humanos, que geralmente não apresentam quadro hiperagudo da infecção e cujas alterações clínicas são menos graves (CURRY, 2017; KEEL; SONGER, 2006; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012).

Nesse sentido, experimentos para a avaliação da resposta imune contra *C. difficile* e/ou seus principais fatores de virulência foram anteriormente realizados em coelhos (COX et al., 2013; LIBBY; WILKINS, 1982). Coelhos Nova Zelândia são amplamente utilizados em ensaios clínicos e reconhecidos por apresentarem elevada resposta imune frente aos inóculos vacinais, sendo um bom modelo de triagem para ensaios posteriores ou mesmo como alternativa para a avaliação da potência de imunógenos, além de seu fácil manejo e manipulação (CAO et al., 2020; FRFRICHS; GRAY, 1975; KIROS et al., 2012; SALVARANI et al., 2013). No presente estudo, os coelhos tiveram a sua resposta imune humoral avaliada frente às diferentes massas antigênicas das vacinas bivalente e químera, para posterior realização de ensaios e avaliação em suínos.

Para avaliação da conferência de resposta imune específica contra o patógeno estudado, incluindo anticorpos anti-toxinas A e B de *C. difficile*, é comum que sejam realizados ensaios imunoenzimáticos indiretos para mensuração de imunoglobulinas G (CHEN et al., 2014; TAN et al., 2012; TIZARD et al., 2010). Dada a maior pureza,

estabilidade e rendimento na produção das proteínas recombinantes se comparado às duas exotoxinas TcdA e TcdB nativas de *C. difficile*, (COHEN et al., 2014; YANG et al., 2008), optou-se pela utilização dos fragmentos recombinantes de A e B pra realização dos ensaios imunoenzimáticos após a vacinação, igualmente ao utilizado em trabalhos anteriores (CHEN et al., 2015; ROMANO et al., 2012).

A ausência de elevadas taxas de absorvância (OD 492nm) no grupo controle, bem como no tempo 0 em todos os grupos vacinados, demonstra a ausência de anticorpos detectáveis anti-toxinas A e B de *C. difficile* previamente à imunização dos animais. Em consequência, sugere-se a ausência de contato dos coelhos com o agente e/ou seus produtos durante a execução do experimento, indicando que os anticorpos detectados posteriormente são consequência da indução vacinal. Nesse sentido, é de se destacar a elevada resposta primária observada 14 dias após a aplicação da primeira dose das vacinas quiméricas e bivalentes, especialmente quando se analisa a resposta imune frente a TcdA. Estudos anteriores conduzidos em camundongos e hamsters também demonstraram maiores títulos de anticorpos frente a alvos recombinantes e toxoides A de *C. difficile* se comparado a TcdB, porém sem interferências na proteção conferida pelos imunógenos (GHOSE et al., 2013; TIAN et al., 2012, 2017).

A elevada absorvância no tempo 28 (posterior à segunda dose) em todos os grupos refletiu maiores títulos de anticorpos neste momento em comparação ao grupo controle, tempos 0, 14 ou mesmo grupo 42, quando considera-se a resposta frente a TcdA e TcdB. Tal fato sinaliza a indução da resposta imune secundária à segunda exposição antigênica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014) e corrobora as análises *in silico* das sequências de aminoácidos de porção C-terminal de TcdA e TcdB realizadas no programa BepiPred 2.0, em que foram visualizadas a presença de regiões possivelmente antigênicas para os linfócitos B. Ainda, há concordância com dados anteriores, que utilizaram fragmentos

recombinantes de TcdA e TcdB similares ao do presente estudo para avaliação da resposta imune em modelos animais (BABCOCK et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2017; KINK; WILLIAMS, 1998; MAYNARD-SMITH et al., 2014; TIAN et al., 2017).

Ainda, a ausência de diferença estatística entre os grupos vacinais de coelhos nos tempos 14 e 42 frente aos antígeno A e B, conforme demonstrado nas figuras 5.3.2.1, demonstra que apenas duas doses vacinais são suficientes para que os títulos de anticorpos atinjam o platô frente a todas as vacinas e doses testadas, o que é similar ao observado em outros estudos (DONALD et al., 2013; LUO et al., 2019, p. 201; TIAN et al., 2012). A queda na absorvância no tempo 42 em todos os esquemas vacinais e antígenos avaliados nesses animais (IgG anti-TcdA e IgG anti-TcdB) não é incomum e já foi observado anteriormente (TIAN et al., 2012), podendo decorrer da formação de imunocomplexos contendo antígenos vacinais utilizados na terceira dose e as imunoglobulinas circulantes, resultando em menores títulos de IgG detectáveis ao ELISA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Os títulos de anticorpos similares frente a utilização das composições vacinais quimérica e bivalente nos coelhos indica que ambas são imunogênicas e, portanto, permite inferir que a utilização do imunógeno Q seja melhor do ponto de vista de produção e formulação do imunizante em escala industrial. Ainda, a resposta humoral similar empregando as diferentes doses antigênicas permite inferir que pelo menos 10 µg são suficientes para a indução de resposta imune no hospedeiro, conferindo maior rendimento do produto com o emprego de menor massa antigênica. É sabida a maior imunogenicidade de antígenos proteicos, que tendem a induzir potente ativação de células B, o que possivelmente está relacionado à elevada resposta imune observada em ambas as composições e mesmo utilizando-se da massa proteica inferior (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Dado os resultados, optou-se pela experimentação em

suínos com as duas composições vacinais utilizando-se o dobro da menor massa antigênica que conferiu indução da imunidade em coelhos, equivalente a 20 µg, dado a maior capacidade de resposta imunológica dos coelhos em relação a animais de maior porte (FERREIRA et al., 2018; 2019; SALVARANI et al., 2013).

Estudos previamente conduzidos em suínos demonstraram a proteção dos animais desafiados por estirpes toxigênicas de *C. difficile* na presença de IgG sérica contra as toxinas A e B (COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014; STEELE et al., 2013a, 2013b). A atividade neutralizante dessas imunoglobulinas é associada à menor ocorrência e/ou gravidade da infecção nos animais neonatos (STEELE et al., 2013a; COHEN et al., 2014; SPONSELLER et al., 2014), motivo pelo qual o último objetivo deste estudo baseou-se na quantificação de IgG em suínos ativamente e passivamente imunizados.

A imunização ativa das matrizes suínas com 20 µg de cada uma das composições antigênicas resultou em indução à resposta contra as proteínas recombinantes A e B de *C. difficile*, cujos dados de absorvância sugerem a presença de elevados títulos de imunoglobulinas G no soro dos animais imunizados em comparação aos de grupo controle, especialmente frente a TcdA. Conforme observado em trabalhos anteriores e nos resultados obtidos em coelhos, é esperado que sejam obtidos menores títulos de anticorpos anti-TcdB se comparado a TcdA, que possivelmente é mais imunogênico (GHOSE et al., 2013; TIAN et al., 2012, 2017). A maior reatividade à proteína TcdA foi evidenciada principalmente em matrizes suínas imunizadas com o antígeno Q, indicando indução de resposta imune superior à vacina bivalente e portanto maior circulação de IgG anti-TcdA nesses animais.

Similarmente ao observado nas porcas, os leitões que receberam colostro das matrizes imunizadas com as vacinas AB e Q apresentaram títulos de anticorpos anti-

TcdA e anti-TcdB superiores aos do grupo controle. Tal achado sugere, portanto, a aquisição passiva da imunidade contra as toxinas A e B de *C. difficile* dos leitões através do colostro advindo de porcas vacinadas com ambos os antígenos, com potencial de proteção contra os principais fatores de virulência do agente em seu período de maior susceptibilidade à infecção, correspondente aos primeiros 10 dias de vida (CRUZ JUNIOR et al., 2013; KEEL; SONGER, 2006; SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012). As análises representadas nas figuras 5.4.2. demonstraram, ainda, a ausência de diferenças significativas entre os títulos de anticorpos presentes nos soros dos leitões passivamente imunizados com as vacinas Q e AB. Nesse sentido, similarmente ao abordado nos resultados obtidos em coelhos, pode-se inferir que a imunização dos animais com a vacina Q é mais vantajosa, dado a maior facilidade de síntese de apenas um produto e a sua formulação em escala industrial.

Dessa forma, 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*. Ainda, que anticorpos contra as toxinas no soro desses animais são passivamente transferidos a leitões neonatos através da colostragem e absorvidos pelo epitélio intestinal em suas primeiras horas de vida (BASTOS; BOMBASSARO; MACIAG, 2022; TIZARD, 2014), demonstrado pela presença de IgG anti-TcdA e anti-TcdB séricos com até 72h após o nascimento.

Estudos futuros são necessários para a avaliação da atividade neutralizante das imunoglobulinas detectadas nos leitões frente às toxinas A e B nativas de *C. difficile*, como através de ensaios de citotoxicidade em células Vero ou HT29 (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; GUPTA et al., 2017; SILVA et al., 2011). Ainda, são necessários estudos para avaliar se a possível atividade neutralizante desses

anticorpos é capaz de conferir proteção aos animais expostos ao agente toxigênico e/ou seus fatores de virulência, com redução das perdas relacionadas à ICD em leitões neonatos. Dados relacionados principalmente à redução no ganho de peso dos animais neonatos afetados representam consideráveis perdas na cadeia produtiva de suínos (SILVA; GUEDES; LOBATO, 2012; SONGER; UZAL, 2005; WEESE, 2020a). A obtenção de uma vacina recombinante eficaz para a prevenção ou controle da infecção por *C. difficile* em leitões significaria um importante avanço na produção suína nacional e internacionalmente. Tal fato é dado às facilidades relacionadas a produção de proteínas imunógenas em sistemas heterólogos (CID; BOLÍVAR, 2021) e a demanda para o controle do agente em plantéis suínos, potencializada pela possível relação entre organismo em sistemas de produção animal e a crescente incidência de casos comunitários em seres humanos (KNIGHT; RILEY, 2019; LIM; KNIGHT; RILEY, 2019; MOLONEY et al., 2021; TSAI et al., 2021).



## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo, que objetivou a seleção de fragmentos antigênicos das toxinas A e B de *C. difficile*, o desenvolvimento de vacinas recombinantes e a realização de ensaios pré-clínicos e clínico na espécie alvo (suínos), demonstrou que, apesar da ausência de proteção em um modelo hamster, as vacinas sintetizadas foram capazes de induzir a produção de anticorpos anti-TcdA e anti-TcdB em coelhos imunizados. Ainda, as proteínas recombinantes sintetizadas foram capazes de induzir títulos de anticorpos contra as proteínas A e B em matrizes suínas, imunoglobulinas que foram passivamente transferidos aos leitões colostrados.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Perspectivas futuras com os dados obtidos com o presente estudo são a verificação da eficácia das vacinas AB e principalmente Q na espécie alvo. Tal observação pode ocorrer por estudos que envolvam a observação da atividade neutralizante dos anticorpos produzidos contra as toxinas nativas A e B de *C. difficile*; a manifestação clínica e/ou lesões macroscópicas e microscópicas em leitões imunizados e desafiados pelo agente, ou mesmo situados em uma granja sabidamente positiva e afetada pelo agente. Ainda, pode-se avaliar a proteção conferida pelos imunógenos sintetizados em comparação com a vacina comercialmente disponível na União Europeia a Suiseng® Diff/A (Hipra, ESP).

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Mecanismos efetores da imunidade humoral. Em: **Imunologia básica**. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 151–170.

ALVAREZ-PEREZ, S. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3–4, p. 302–305, jun. 2009.

AMINZADEH, A. et al. Detoxification of toxin A and toxin B by copper ion-catalyzed oxidation in production of a toxoid-based vaccine against *Clostridioides difficile*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 433–446, nov. 2020.

ANDERSON, M. A.; SONGER, J. G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in swine. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1–2, p. 204–206, abr. 2008.

ANDRÉS-LASHERAS, S. et al. Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 462–472, fev. 2017.

ANOSOVA, N. G. et al. Systemic antibody responses induced by a two-component *Clostridium difficile* toxoid vaccine protect against *C. difficile*-associated disease in hamsters. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1394–1404, 1 set. 2013.

ARTIUSHIN, S. et al. Immunisation of mares with binding domains of toxins A and B of *Clostridium difficile* elicits serum and colostral antibodies that block toxin binding. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 4, p. 476–480, jul. 2013.

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.

BABCOCK, G. J. et al. Human Monoclonal Antibodies Directed against Toxins A and B Prevent *Clostridium difficile*-Induced Mortality in Hamsters. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6339–6347, 1 nov. 2006.

BARTLETT, J. G. et al. Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing *Clostridia*. **New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 10, p. 531–534, 9 mar. 1978.

BARTLETT, J. G. Antibiotic-Associated Diarrhea. **The New England Journal of Medicine**, p. 6, 2002.

BASTOS, A.; BOMBASSARO, G.; MACIAG, S. **A importância do colostro para o leitão recém-nascido**. Embrapa, , 2022.

BELIYI, I. F.; VARFOLOMEEVA, N. A. Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins. **FEMS microbiology letters**, v. 225, n. 2, p. 325–329, 29 ago. 2003.

BEST, E. L.; FREEMAN, J.; WILCOX, M. H. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 145–167, mar. 2012.

BJÖERSDORFF, O. G. et al. Dogs are carriers of *Clostridioides difficile* lineages associated with human community-acquired infections. **Anaerobe**, v. 67, p. 102317, fev. 2021.

BLAND, S. J. et al. Deletion of a 19-Amino-Acid Region in *Clostridioides difficile* TcdB2 Results in Spontaneous Autoprocessing and Reduced Cell Binding and Provides a Nontoxic Immunogen for Vaccination. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 8, p. e00210-19, ago. 2019.

BRADSHAW, W. J. et al. Molecular features of lipoprotein CD0873: A potential vaccine against the human pathogen *Clostridioides difficile*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 43, p. 15850–15861, out. 2019.

BRASIL. PORTARIA Nº 49. REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUÇÃO, CONTROLE E EMPREGO DE VACINAS CONTRA O CARBÚNCULO SINTOMÁTICO, GANGRENA GASOSA, ENTEROTOXEMIA E TÉTANO. . 12 maio 1997.

BRASIL. **Resolução normativa nº 37 - Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA.** , 2018.

BROECKER, F. et al. Synthetic Oligosaccharide-Based Vaccines Protect Mice from *Clostridioides difficile* Infections. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 12, p. 2720–2728, 20 dez. 2019.

BROUWER, M. S. M. et al. Horizontal gene transfer converts non-toxicogenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 2601, dez. 2013.

BRUXELLE, J.-F.; PÉCHINÉ, S.; COLLIGNON, A. Immunization Strategies Against *Clostridium difficile*. **Adv Exp Med Biol**, Advances in Experimental Medicine and Biology. v. 8, p. 197–225, 2018.

BURT, S. A. et al. Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1–2, p. 256–258, nov. 2012.

CANÇADO, G. G. L. et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, v. 54, p. 65–71, dez. 2018.

CAO, Z. et al. Establishment of a method for evaluation of the efficacy of a classical swine fever virus subunit vaccine in rabbits. **American Journal of Veterinary Research**, v. 81, n. 6, p. 521–526, 1 jun. 2020.

CARVALHO, G. M. et al. Laboratory diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in domestic animals: A short review. **Anaerobe**, v. 75, p. 102574, 1 jun. 2022.

CASTRO, J. C. DE et al. Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 394–401, 2021.

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, USA: U. S. Department of Health and Human Services, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>>.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in Clostridium difficile infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 723–750, 1 nov. 2017.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303, 2013.

CHART, H. et al. An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5 $\alpha$  and EQ1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, 2000.

CHEN, W. et al. Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies to the receptor binding region of Clostridium difficile toxin B. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 5, p. 7712–7720, nov. 2015.

CID, R.; BOLÍVAR, J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1072, 21 jul. 2021.

COHEN, O. R. 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, n. 10, p. e111075, 27 out. 2014.

COX, A. D. et al. Investigating the candidacy of a lipoteichoic acid-based glycoconjugate as a vaccine to combat Clostridium difficile infection. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, n. 9, p. 843–855, dez. 2013.

CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 12, p. 1053–1066, 2009.

CROBACH, M. J. T. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. S63–S81, ago. 2016.

CRUZ JUNIOR, E. C. et al. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 963–969, ago. 2013.

CURRY, S. R. Clostridium difficile. **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 2, p. 341–369, jun. 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.

DEPESTEL, D. D.; ARONOFF, D. M. Epidemiology of Clostridium difficile Infection. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 26, n. 5, p. 464–475, out. 2013.

DHOM-LEMONS, L. et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 31 jan. 2019.

DINGLE, K. E. et al. Clinical Clostridium difficile: Clonality and Pathogenicity Locus Diversity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19993, maio 2011.

DINGLE, K. E. et al. A Role for Tetracycline Selection in Recent Evolution of Agriculture-Associated *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078. **mBio**, v. 10, n. 2, p. e02790-18, /mbio/10/2/mBio.02790-18.atom, 12 mar. 2019.

DINGLE, T. et al. Functional properties of the carboxy-terminal host cell-binding domains of the two toxins, TcdA and TcdB, expressed by Clostridium difficile. **Glycobiology**, v. 18, n. 9, p. 698–706, set. 2008.

DONALD, R. G. K. et al. A novel approach to generate a recombinant toxoid vaccine against Clostridium difficile. **Microbiology**, v. 159, n. Pt\_7, p. 1254–1266, 1 jul. 2013.

EHRICH, M. et al. Production of Clostridium difficile antitoxin. **Infection and Immunity**, v. 28, n. 3, p. 1041–1043, jun. 1980.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa**. UNIFESP, , 2019.

FEIGE, M. J. et al. The structure of a folding intermediate provides insight into differences in immunoglobulin amyloidogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13373–13378, 9 set. 2008.

FERNIE, D. S. et al. Active and passive immunization to protect against antibiotic associated caecitis in hamsters. **Developments in biological standardization**, v. 53, p. 325–332, 1983.

FERREIRA, M.R.A. et al. Immunogenicity of Clostridium perfringens epsilon toxin recombinant bacterin in rabbit and ruminants. **Vaccine**. v. 36, n. 50, p. 7589-7592. 2018

FERREIRA, M.R.A. et al. Inactivated recombinant Escherichia coli as a candidate vaccine against Clostridium perfringens alpha toxin in sheep. **Anaerobe**. v. 59, p. 163-166. 2019.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant Leishmania infantum antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25–30, 2014.

FREEMAN, J. et al. The Changing Epidemiology of Clostridium difficile Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 529–549, jul. 2010.

FRFRICHS, G. N.; GRAY, A. K. The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. **Research in Veterinary Science**, v. 18, n. 1, p. 70–75, 1 jan. 1975.

GEMEIN, S. et al. Efficacy of five ‘sporicidal’ surface disinfectants against *Clostridioides difficile* spores in suspension tests and 4-field tests. **Journal of Hospital Infection**, v. 122, p. 140–147, 1 abr. 2022.

GERDING, D. N. et al. Administration of Spores of Nontoxicogenic *Clostridium difficile* Strain M3 for Prevention of Recurrent *C difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 313, n. 17, p. 1719, 5 maio 2015.

GHOSE, C. et al. Toll-like receptor 5-dependent immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein vaccine containing the nontoxic domains of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Salmonella enterica* serovar typhimurium flagellin in a mouse model of *Clostridium difficile* disease. **Infection and immunity**, v. 81, n. 6, p. 2190–2196, jun. 2013.

GHOSE, C. et al. Immunogenicity and protective efficacy of *Clostridium difficile* spore proteins. **Anaerobe**, v. 37, p. 85–95, fev. 2016.

GIANNASCA, P. J. et al. Serum Antitoxin Antibodies Mediate Systemic and Mucosal Protection from *Clostridium difficile* Disease in Hamsters. **INFECT. IMMUN.**, v. 67, p. 12, 1999.

GOORHUIS, A. et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1157; author reply 1158, mar. 2008.

GOTTESMAN, S.; WICKNER, S.; MAURIZI, M. R. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. **Genes & Development**, v. 11, n. 7, p. 815–823, 1 abr. 1997.

GRECO, A. et al. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 5, p. 460–461, maio 2006.

GU, T. et al. Systematic review of guidelines for the diagnosis and treatment of *Clostridioides difficile* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 926482, 30 ago. 2022.

GUH, A. Y. et al. Trends in U.S. Burden of *Clostridioides difficile* Infection and Outcomes. **The New England journal of medicine**, v. 382, n. 14, p. 1320–1330, 2 abr. 2020.

GUPTA, P. et al. Functional defects in *Clostridium difficile* TcdB toxin uptake identify CSPG4 receptor-binding determinants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 42, p. 17290–17301, out. 2017.

HALL, I.; O’TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. v. 49, p. 390–402, 1935.

HANG’OMBE, B. M. et al. Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 23, n. 4, p. 277–284, out. 2000.

- HENSGENS, M. P. M. et al. Clostridium difficile infection in the community: a zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 635–645, jul. 2012.
- HERNANDEZ, L. D. et al. Broad Coverage of Genetically Diverse Strains of Clostridium difficile by Actoxumab and Bezlotoxumab Predicted by *In Vitro* Neutralization and Epitope Modeling. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1052–1060, fev. 2015.
- HERNANDEZ, L. D. et al. Epitopes and Mechanism of Action of the Clostridium difficile Toxin A-Neutralizing Antibody Actoxumab. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 7, p. 1030–1044, abr. 2017.
- HO, J. G. S. et al. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from Clostridium difficile toxin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18373–18378, dez. 2005.
- HUSSACK, G. et al. Neutralization of *Clostridium difficile* Toxin A with Single-domain Antibodies Targeting the Cell Receptor Binding Domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 8961–8976, 18 mar. 2011.
- HUSSACK, G. et al. Neutralization of Clostridium difficile toxin B with VHH-Fc fusions targeting the delivery and CROPs domains. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208978, 12 dez. 2018.
- JANEZIC, S. et al. Clostridium difficile genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 48, 27 mar. 2012.
- JANEZIC, S. et al. International Clostridium difficile animal strain collection and large diversity of animal associated strains. **BMC microbiology**, v. 14, p. 173, jun. 2014.
- JONES, M. A.; HUNTER, D. Isolation of Clostridium difficile from pigs. **The Veterinary record**, v. 112, n. 11, p. 253, 12 mar. 1983.
- KARCZEWSKI, J. et al. Development of a recombinant toxin fragment vaccine for Clostridium difficile infection. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2812–2818, 19 maio 2014.
- KARYAL, C. et al. Mimicking Native Display of CD0873 on Liposomes Augments Its Potency as an Oral Vaccine against Clostridioides difficile. **Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1453, 8 dez. 2021.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, jan. 2018.
- KEEL, K. et al. Prevalence of PCR Ribotypes among Clostridium difficile Isolates from Pigs, Calves, and Other Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1963–1964, 1 jun. 2007.
- KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The Comparative Pathology of *Clostridium difficile* - associated Disease. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 3, p. 225–240, maio 2006.



KEEL, M. K.; SONGER, J. G. The Attachment, Internalization, and Time-Dependent, Intracellular Distribution of *Clostridium difficile* Toxin A in Porcine Intestinal Explants. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 369–380, mar. 2011.

KEESSEN, E. C. et al. Evaluation of Four Different Diagnostic Tests To Detect *Clostridium difficile* in Piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1816–1821, maio 2011.

KIM, H.-Y. et al. High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. **Anaerobe**, v. 51, p. 42–46, jun. 2018.

KIM, P.-H.; IACONIS, J. P.; ROLFE, R. D. Immunization of Adult Hamsters against *Clostridium difficile*-Associated Ileocectitis and Transfer of Protection to Infant Hamsters. **INFECT. IMMUN.**, v. 55, p. 9, 1987.

KIM, P.-H.; ROLFE, R. D. Characterisation of Protective Antibodies in Hamsters Immunised Against *Clostridium difficile* Toxins A and B. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2, n. 1, p. 47–59, jan. 1989.

KINK, J. A.; WILLIAMS, J. A. Antibodies to Recombinant *Clostridium difficile* Toxins A and B Are an Effective Treatment and Prevent Relapse of *C. difficile*-Associated Disease in a Hamster Model of Infection. **INFECT. IMMUN.**, v. 66, p. 8, 1998.

KIROS, T. G. et al. The Importance of Animal Models in the Development of Vaccines. Em: BASCHIERI, S. (Ed.). **Innovation in Vaccinology: from design, through to delivery and testing**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 251–264.

KISHORE, J.; GOEL, M.; KHANNA, P. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. **International Journal of Ayurveda Research**, v. 1, n. 4, p. 274, 2010.

KNETSCH, C. et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 45, p. 20954, 13 nov. 2014.

KNETSCH, C. W. et al. Zoonotic Transfer of *Clostridium difficile* Harboring Antimicrobial Resistance between Farm Animals and Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. e01384-17, mar. 2018.

KNIGHT, D. R. et al. Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 11 jan. 2017.

KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Genomic Delineation of Zoonotic Origins of *Clostridium difficile*. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 164, 2019.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Laboratory Detection of *Clostridium difficile* in Piglets in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 3856–3862, nov. 2014.

KNIGHT, D. R.; SQUIRE, M. M.; RILEY, T. V. Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal pigs shows high prevalence and

heterogeneity of PCR ribotypes. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 1, p. 119–123, jan. 2015.

KRIJGER, I. M. et al. Clostridium difficile in wild rodents and insectivores in the Netherlands. **Letters in applied microbiology**, v. 69, n. 1, p. 35–40, jul. 2019.

KRUTOVA, M. et al. The emergence of Clostridium difficile PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with Clostridium difficile PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 770–775, out. 2018.

KUEHNE, S. A. et al. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 711–713, out. 2010.

KYNE, L. et al. Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 6, p. 390–397, fev. 2000.

KYNE, L. et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea. **THE LANCET**, v. 357, p. 5, 2001.

LARSON, H. E.; BORRIELLO, S. P. Quantitative study of antibiotic-induced susceptibility to Clostridium difficile enterocolitis in hamsters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 7, p. 1348–1353, jul. 1990.

LEAV, B. A. et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent Clostridium difficile infection (CDI). **Vaccine**, v. 28, n. 4, p. 965–969, 22 jan. 2010.

LEUZZI, R. et al. Protective efficacy induced by recombinant Clostridium difficile toxin fragments. **Infect Immun**, v. 81, n. 8, p. 2851–2860, ago. 2013.

LI, Z. et al. Ribotype Classification of Clostridioides difficile Isolates Is Not Predictive of the Amino Acid Sequence Diversity of the Toxin Virulence Factors TcdA and TcdB. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1310, 19 jun. 2020.

LIBBY, J. M.; WILKINS, T. D. Production of Antitoxins to Two Toxins of Clostridium difficile and Immunological Comparison of the Toxins by Cross-Neutralization Studies. p. 3, 1982.

LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. Clostridium difficile and One Health. **Clinical Microbiology and Infection**, p. S1198743X19305592, nov. 2019.

LIPPKE, R. T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 505–510, jun. 2011.

LUO, D. et al. Immunogenicity and Protection from Receptor-Binding Domains of Toxins as Potential Vaccine Candidates for Clostridium difficile. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 180, 8 nov. 2019.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. Clostridium difficile: its disease and toxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 1, n. 1, p. 1–18, jan. 1988.

- MAASS, D. R. et al. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). **Journal of Immunological Methods**, v. 324, n. 1–2, p. 13–25, jul. 2007.
- MAIA, A. R. et al. Induction of a Specific Humoral Immune Response by Nasal Delivery of BclA2ctd of *Clostridioides difficile*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1277, 14 fev. 2020.
- MAYFIELD, J. L. et al. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 995–1000, out. 2000.
- MAYNARD-SMITH, M. et al. Recombinant antigens based on toxins A and B of *Clostridium difficile* that evoke a potent toxin-neutralising immune response. **Vaccine**, v. 32, n. 6, p. 700–705, fev. 2014.
- MCDONALD, L. C. et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 7, p. e1–e48, mar. 2018.
- MERRIGAN, M. M. et al. Prevention of Fatal *Clostridium difficile* –Associated Disease during Continuous Administration of Clindamycin in Hamsters. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 12, p. 1922–1927, 15 dez. 2003.
- MILLS, J. P.; RAO, K.; YOUNG, V. B. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 34, n. 1, p. 3–10, jan. 2018.
- MOLONEY, G. et al. Human and Porcine Transmission of *Clostridioides difficile* Ribotype 078, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 9, set. 2021.
- NAGARO, K. J. et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* Protects Hamsters against Challenge with Historic and Epidemic Strains of Toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5266–5270, nov. 2013.
- NÍ EIDHIN, D. B. et al. Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 207–218, mar. 2008.
- NYBLADE, C. et al. Establishment of a gnotobiotic pig model of *Clostridioides difficile* infection and disease. **Gut Pathogens**, v. 14, n. 1, p. 22, dez. 2022.
- OLIVEIRA JUNIOR, C. A. et al. Rodents are carriers of *Clostridioides difficile* strains similar to those isolated from piglets. **Anaerobe**, v. 51, p. 61–63, 1 jun. 2018.
- OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. The non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 can prevent infection by *C. difficile* in experimental model piglets. **Anaerobe**, v. 55, p. 24–28, fev. 2019a.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. Non-toxigenic strain of *Clostridioides difficile* Z31 reduces the occurrence of *C. difficile* infection (CDI) in one-day-old piglets on a commercial pig farm. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 1–6, abr. 2019b.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. DE et al. Prevention of *Clostridium difficile* infection in hamsters using a non-toxigenic strain. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 853–859, mar. 2016.

ORTH, P. et al. Mechanism of Action and Epitopes of *Clostridium difficile* Toxin B-neutralizing Antibody Bezlotoxumab Revealed by X-ray Crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18008–18021, jun. 2014.

OTTEN, A. M. et al. Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 6, p. 907–914, jun. 2010.

PACHECO, B. et al. A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 33–41, jan. 2012.

PÉCHINÉ, S. et al. Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 73–81, out. 2011.

PINO, F. A. A QUESTÃO DA NÃO NORMALIDADE: uma revisão. **Rev. de Economia Agrícola**, v. 61, n. 2, p. 17–33, 2014.

PLANCHE, T. D. et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 13, n. 11, p. 936–945, nov. 2013.

PLANCHE, T.; WILCOX, M. Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 1, p. 1–5, jan. 2011.

PORTELA, R. D. et al. *Leishmania infantum*-derived lipophosphoglycan as an antigen in the accurate serodiagnosis of canine leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1–19, set. 2019.

POST, K. W.; SONGER, J. G. **Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis**. Proceedings of the 44th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. **Anais...**2001.

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.

PUTSATHIT, P. et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from piglets. **Veterinary microbiology**, v. 237, p. 108408, out. 2019.

RAMOS, C. P. et al. Immunochromatographic test and ELISA for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and A/B toxins as an alternative for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile*-associated diarrhea in foals and neonatal piglets. **Brazilian Journal of Microbiology**, 3 maio 2020.

- RAZIM, A.; GÓRSKA, S.; GAMIAN, A. Non-Toxin-Based Clostridioides difficile Vaccination Approaches. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 235, 2 fev. 2023.
- REIGADAS, E. et al. How to: prophylactic interventions for prevention of Clostridioides difficile infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 12, p. 1777–1783, dez. 2021.
- RILEY, T. V.; LYRAS, D.; DOUCE, G. R. Status of vaccine research and development for Clostridium difficile. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p. 7300–7306, nov. 2019.
- ROBERTS, A. et al. Development and Evaluation of an Ovine Antibody-Based Platform for Treatment of Clostridium difficile Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 875–882, fev. 2012.
- RODRIGUEZ, C. et al. Clostridium difficile in Food and Animals: A Comprehensive Review. **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 932, p. 65–92, 2016.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. Clostridium difficile in foods and animals: history and measures to reduce exposure. **Animal health research reviews**, v. 14, n. 1, p. 11–29, jun. 2013.
- ROMANO, V. et al. Toxigenic Clostridium difficile PCR ribotypes from wastewater treatment plants in southern Switzerland. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6643–6646, set. 2012.
- ROZEMA, D.; GELLMAN, S. H. Artificial chaperones: protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 8, p. 2373–2374, 1995.
- RUPNIK, M. et al. Clostridium difficile Toxinotype V, Ribotype 078, in Animals and Humans. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 6, 2008.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 29 nov. 2007.
- SALVARANI, F. M. et al. In vitro evaluation of Clostridium septicum alpha toxoid. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 778–783, ago. 2010.
- SALVARANI, F. M. et al. Vaccination with recombinant Clostridium perfringens toxoids  $\alpha$  and  $\beta$  promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. **Vaccine**, v. 31, n. 38, p. 4152–4155, ago. 2013.
- SAMBOL, S. P. et al. Colonization for the Prevention of Clostridium difficile Disease in Hamsters. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1781–1789, 15 dez. 2002.
- SAMPAIO, IVAN BARBOSA MACHADO. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 4. ed. [s.l.] UFMG, 1998.

SAUERBORN, M.; LEUKEL, P.; VON EICHEL-STREIBER, C. The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. **FEMS microbiology letters**, v. 155, n. 1, p. 45–54, 1 out. 1997.

SECORE, S. et al. Development of a Novel Vaccine Containing Binary Toxin for the Prevention of *Clostridium difficile* Disease with Enhanced Efficacy against NAP1 Strains. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170640, 26 jan. 2017.

SIDDIQUI, F. et al. Vaccination With Parenteral Toxoid B Protects Hamsters Against Lethal Challenge With Toxin A–Negative, Toxin B–Positive *Clostridium difficile* but Does Not Prevent Colonization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 1, p. 128–133, 1 jan. 2012.

SILVA et al. *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1062–1065, dez. 2015.

SILVA, R. O. S. et al. Detection of enterotoxin A and cytotoxin B, and isolation of *Clostridium difficile* in piglets in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1430–1435, jul. 2011.

SILVA, R. O. S. et al. Padronização de um modelo de infecção por *Clostridium difficile* em hamsters sírios *Mesocricetus auratus*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1415–1421, 2014a.

SILVA, R. O. S. et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 841–846, maio 2014b.

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. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Swine Health and Production**, v. 8, n. 4, p. 5, 2000.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 321–326, dez. 2004.

SONGER, J. G. et al. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxigenic organisms. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 358–361, 6 out. 2007.

SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. **Anaerobe**, v. 12, n. 1, p. 1–4, fev. 2006.

SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial Enteric Infections in Pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 528–536, nov. 2005.

SPENCER, J. et al. Vaccination against *Clostridium difficile* using toxin fragments: Observations and analysis in animal models. **Gut microbes**, v. 5, n. 2, p. 225–232, abr. 2014.

SPONSELLER, J. K. et al. Hyperimmune Bovine Colostrum as a Novel Therapy to Combat *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Infectious Diseases**, p. jiu605, 7 nov. 2014.

STEELE, J. et al. Piglet models of acute or chronic *Clostridium difficile* illness. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 3, p. 428–434, 1 fev. 2010.

STEELE, J. et al. Antibody Against TcdB, but Not TcdA, Prevents Development of Gastrointestinal and Systemic *Clostridium difficile* Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 2, p. 323–330, 15 jan. 2013a.

STEELE, J. et al. Hyperimmune bovine colostrum for treatment of GI infections: A review and update on *Clostridium difficile*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1565–1568, 13 jul. 2013b.

STONE, N. E. et al. Domestic canines do not display evidence of gut microbial dysbiosis in the presence of *Clostridioides (Clostridium) difficile*, despite cellular susceptibility to its toxins. **Anaerobe**, v. 58, p. 53–72, ago. 2019.

TIAN, J.-H. et al. A novel fusion protein containing the receptor binding domains of *C. difficile* toxin A and toxin B elicits protective immunity against lethal toxin and spore challenge in preclinical efficacy models. **Vaccine**, v. 30, n. 28, p. 4249–4258, jun. 2012.

TIAN, J.-H. et al. *Clostridium difficile* chimeric toxin receptor binding domain vaccine induced protection against different strains in active and passive challenge models. **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4079–4087, jul. 2017.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

TORRES, J. F. et al. Evaluation of Formalin-Inactivated *Clostridium difficile* Vaccines Administered by Parenteral and Mucosal Routes of Immunization in Hamsters. **INFECT. IMMUN.**, v. 63, p. 9, 1995.

TSAI, C.-S. et al. *Clostridioides difficile* infection: an emerging zoonosis? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 12, p. 1543–1552, 2 dez. 2021.

TUCKER, K. D.; WILKINS, T. D. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 73–78, 1991.

USUI, M. et al. Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. **Anaerobe**, v. 43, p. 15–20, fev. 2017.

VALLEJO, L.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, n. 1, p. 11, 2004.

WANG, H. et al. A Chimeric Toxin Vaccine Protects against Primary and Recurrent *Clostridium difficile* Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 8, p. 2678–2688, ago. 2012.

WANG, S. et al. Novel Chimeric Protein Vaccines Against *Clostridium difficile* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2440, 22 out. 2018.

WANG, Y.-K. et al. A chimeric protein comprising the glucosyltransferase and cysteine proteinase domains of toxin B and the receptor binding domain of toxin A induces protective immunity against *Clostridium difficile* infection in mice and hamsters. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 9, p. 2215–2222, set. 2015.

WATERS, E. H. et al. Typhlocolitis Caused by *Clostridium Difficile* in Suckling Piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 104–108, jan. 1998.

WEESE, J. S. et al. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5009–5011, ago. 2009.

WEESE, J. S. et al. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. **Anaerobe**, v. 16, n. 5, p. 501–504, out. 2010.

WEESE, J. S. *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, 2020a.

WEESE, J. S. *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, p. 104063871989908, jan. 2020b.

WILKINS, T. D.; LYERLY, D. M. *Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 531–534, fev. 2003.

WILSON, K. H.; SHEAGREN, J. N. Antagonism of Toxigenic *Clostridium difficile* by Nontoxigenic *C. difficile*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 4, p. 733–736, 1 abr. 1983.

WINTER, K. et al. Vaccination against *Clostridium difficile* by Use of an Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Vector (YS1646) Protects Mice from Lethal Challenge. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 8, p. e00089-19, ago. 2019.

XU, C. et al. Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 891–904, 1 set. 2014.

YAEGER, M.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 14, n. 4, p. 281–287, jul. 2002.

YAEGER, M. J.; KINYON, J. M.; SONGER, J. G. A Prospective, Case Control Study Evaluating the Association between *Clostridium Difficile* Toxins in the Colon of Neonatal Swine and Gross and Microscopic Lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 1, p. 52–59, jan. 2007.

YANG, G. et al. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 192, dez. 2008.



YANG, W.-W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 27–33, jan. 2009.

ZHANG, S. et al. Cost of hospital management of *Clostridium difficile* infection in United States-a meta-analysis and modelling study. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 447, 25 ago. 2016.

## 10. ANEXOS

1

### 10.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de uma vacina recombinante para a prevenção da infecção por Clostridioides difficile em leitões", protocolo do CEUA: 277/2020 sob a responsabilidade de Francisco Carlos Faria Lobato que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 22/02/2021.

Vigência da Autorização	22/02/2021 a 21/02/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Hamster / Hamster sírio
Nº de animais	21
Peso/Idade	280g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério de criação de hamster - Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Suíno / Landrace
Nº de animais	10
Peso/Idade	200kg / 12(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa - EV/UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Suíno / Landrace
Nº de animais	50
Peso/Idade	1500g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa - EV/UFMG

Considerações posteriores:

22/02/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 22/02/2021. Validade: 22/02/2021 à 21/02/2026
------------	---

Belo Horizonte, 24/03/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceuaf/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceuaf)