

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Avaliação de vacinas recombinantes pentavalentes contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* em ovinos**

**Jaqueline Freitas Motta**

Pelotas, 2022

**Jaqueline Freitas Motta**

**Avaliação de vacinas recombinantes pentavalentes contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* em ovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M921a Motta, Jaqueline Freitas

Avaliação de vacinas recombinantes pentavalentes contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* em ovinos / Jaqueline Freitas Motta ; Fabricio Rochedo Conceição, Felipe Masiero Salvarani, orientadores ; Marcos Roberto Alves Ferreira, coorientador. — Pelotas, 2023.

88 f. : il.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Clostridioses. 2. Vacinas veterinárias. 3. Toxinas clostridiais. 4. Biotecnologia. 5. Antitoxinas. I. Conceição, Fabricio Rochedo, orient. II. Salvarani, Felipe Masiero, orient. III. Ferreira, Marcos Roberto Alves, coorient. IV. Título.

CDD : 636.08965372

Jaqueline Freitas Motta

Avaliação de vacinas recombinantes pentavalentes contra *Clostridium perfringens* e  
*Clostridium botulinum* em ovinos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências,  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03/03/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Orientador)  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade de Wisconsin

Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Marcos Roberto Alves Ferreira  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedicatória**

**Aos meus familiares, pilares de minha existência.**

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradecer à minha família por estar sempre ao meu lado.

Gratidão ao Universo por me permitir ser Mãe de uma criança tão linda saudável e abençoada chamada Ana Luísa. Gratidão ao meu marido Paulo Henrique por estar sempre presente, pai amoroso, grande companheiro.

Gratidão a todos amigos e colegas do querido “Lab. 6” os quais foram de extrema paciência e amizade comigo, dispendendo tempo para ensinar as técnicas que permitiram a realização deste trabalho. Em especial ao Marcos, Rafa Rodrigues, Rafa Donassolo, Lucas, Mari por todos os momentos de aprendizado e descontração.

Ao meu orientador Fabricio Rochedo Conceição, por todos os ensinamentos, pela compreensão e paciência.

Gratidão as minhas amigas queridas Alessandra Teles, Cristina Peter e Sara Patron por todos os momentos que passamos juntas. Atualmente tomamos rumos diferentes, mas tenho certeza que nossa amizade continuará a mesma.

Saudades de todos. Os guardo em minha memória e coração.

***“Que toda paz venha do alto, que todo amor venha de dentro, que todo bem esteja ao redor”.***

## Resumo

MOTTA, Jaqueline Freitas. **Avaliação de vacinas recombinantes pentavalentes contra *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* em ovinos.** 2022. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

As clostridioses são enfermidades letais que afetam animais domésticos e são causadas por bactérias do gênero *Clostridium*. Devido às suas características de rápida progressão e alta letalidade, o controle efetivo dessas doenças é alcançado principalmente por meio de estratégias profiláticas, como a vacinação. No entanto, as vacinas comerciais disponíveis tradicionalmente são baseadas em toxoides inativados usando formaldeído, o que apresenta desafios na manufatura, como riscos de biossegurança e complexos processos de inativação. Como alternativa, protótipos de vacinas recombinantes têm sido avaliados, demonstrando vantagens significativas em termos de produção e imunogenicidade. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a eficácia de duas formulações (antígenos purificados e não purificados) compostas de antígenos recombinantes de *Clostridium perfringens*, toxina épsilon (ETX) e porção C-terminal da toxina alfa (rCPAc) e beta (rCPBc), e *Clostridium botulinum*, toxinas botulínicas C (rBoNTC) e D (rBoNTD), em ovinos. Os testes de esterilidade e inocuidade seguiram as diretrizes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Na análise sorológica, ambas formulações vacinais induziram títulos elevados de anticorpos totais e neutralizantes contra os antígenos de *C. perfringens* e *C. botulinum* em comparação com o grupo controle negativo. Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos para rCPBc, rETX, rBoNTC e rBoNTD foram de  $\leq 10$ ,  $\geq 2$ ,  $\leq 1$  e 5 UI/mL para formulação não purificada e de  $\leq 10$ ,  $\geq 2$ ,  $\leq 1$  e 10 UI/mL para formulação purificada. Os títulos mínimos recomendados pelo MAPA são de 10, 2, 5 e 2 UI/mL para os antígenos supracitados. Os títulos de antitoxina anti-CPA não foram mensurados por impossibilidade de aquisição dos insumos necessários para realização da soroneutralização. As análises de longevidade dos títulos de anticorpos totais anti-CPA, CPB e ETX mostraram que não houve aumento na resposta de anticorpos após a segunda dose, e os títulos começaram a diminuir após esse ponto. Para BoNTC e BoNTD, houve um leve aumento nos títulos após a segunda dose, mas eles começaram a diminuir após o dia 56. Esse padrão de resposta foi observado em ambas as formulações recombinantes. Embora estudos anteriores já tenham demonstrado o potencial imunogênico dos antígenos recombinantes em modelos animais e nas espécies-alvo, os resultados deste estudo sugerem que, apesar da promissora resposta imune induzida pelas vacinas recombinantes pentavalentes em ovinos, refinamentos na formulação podem ser necessários para otimizar a duração e magnitude da resposta imune.

**Palavras-chave:** clostridioses; toxinas clostridiais; antitoxinas; vacinas veterinárias; biotecnologia



## Abstract

MOTTA, Jaqueline Freitas. **Evaluation of pentavalent recombinant vaccines against *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum* in sheep.** 2022. 87f. Thesis (Doctorate in Science) - Postgraduate Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Clostridiosis are lethal diseases that affect domestic animals and are caused by bacteria of the genus *Clostridium*. Due to their characteristics of rapid progression and high lethality, effective control of these diseases is carried out mainly through prophylactic strategies, such as vaccination. However, available commercial vaccines are based on toxoids inactivated using formaldehyde, which presents challenges in production, such as biosafety risks and complex inactivation processes. As an alternative, recombinant vaccine prototypes were evaluated, demonstrating significant advantages in terms of production and immunogenicity. In this context, the present study evaluated the efficacy of two formulations (purified and non-purified antigens) composed of recombinant antigens from *Clostridium perfringens*, epsilon toxin (ETX) and C-terminal alpha (rCPAc) and beta (rCPBc) toxin function, and *Clostridium botulinum*, botulinum toxins C (rBoNTC) and D (rBoNTD), in sheep. The sterility and safety tests followed the guidelines of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). In serological analysis, both vaccine formulations induced high levels of total and neutralizing antibodies against *C. perfringens* and *C. botulinum* antigens compared to the negative control group. The neutralizing antibody titers induced for rCPBc, rETX, rBoNTC and rBoNTD were  $\leq 10$ ,  $\geq 2$ ,  $\leq 1$  and 5 IU/mL for the unpurified formulation and  $\leq 10$ ,  $\geq 2$ ,  $\leq 1$  and 10 IU/mL for the purified. The minimum levels recommended by MAPA are 10, 2, 5 and 2 IU/mL for the afore mentioned antigens. Anti-CPA antitoxin titers were not measured due to the impossibility of purchasing the necessary inputs to carry out serum neutralization. Longevity analyzes of total anti-CPA, CPB, and ETX antibody titers demonstrated that there was no increase in antibody response after the second dose, and titers began to decrease after that point. For BoNTC and BoNTD, there was a level increase in titers after the second dose, but they had a decrease after day 56. This pattern of response was shown in both recombinant formulations. Although previous studies have already demonstrated the immunogenic potential of recombinant antigens in animal models and target species, the results of this study suggest that despite the promise of an immune response caused by pentavalent recombinant vaccines in sheep, refinements in the formulation may be necessary to modify the duration and magnitude of the immune response.

**Keywords:** clostridiosis; clostridial toxins; antitoxins; veterinary vaccines; biotechnology