

DESAFIO LETAL EM CAMUNDONGOS COM ESPOROS DE *Clostridium chauvoei*: ALTERNATIVA AO ENSAIO EM COBAIOS.

CRISTIAN HENRIQUE SOTT¹; CLÓVIS MOREIRA JÚNIOR²; MARTINA ALVES LEAL³; WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES⁴; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵ e ANGELA NUNES MOREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – cmoreira.biotec@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – martinaalves0124@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – welingtonmateuspdemores@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* compreende diversas espécies bacterianas anaeróbicas estritas, Gram-positivas, encontradas no ambiente e na microbiota de animais saudáveis, inclusive em humanos. Caracterizam-se pela produção de esporos como forma de resistência, permanecendo viáveis no solo por longos períodos até encontrarem condições favoráveis à sua germinação (LOBATO et al., 2013). Algumas espécies são patogênicas causando doenças denominadas clostridioses (GOMES, 2013; LOBATO et al., 2013; UZAL, 2012).

As clostridioses apresentam impactos significativos em animais domésticos e de produção, causando prejuízos à pecuária devido a altas taxas de letalidade. Em particular, o *Clostridium chauvoei* causa uma doença caracterizada por necrose muscular (mionecrose) de difícil tratamento (VARGAS, 2005), denominada Carbúnculo Sintomático (HATHEWAY, 1990), popularmente conhecida como manqueira. A doença acomete principalmente bovinos jovens, entre quatro meses e três anos de idade no mais alto nível nutricional (GOMES, 2013), sendo uma enfermidade economicamente importante. Clinicamente, os animais apresentam temperatura elevada, anorexia, depressão e manqueira (ASSIS, 2005).

A vacinação é a forma mais eficiente de prevenção contra clostridioses, reduzindo significativamente a incidência nos animais (LOBATO et al., 2013). Embora a vacinação não seja obrigatória, são aplicadas anualmente mais de 250 milhões de doses de vacinas clostridiais (ALVES et al., 2017) evidenciando a importância em se combater os prejuízos causados por essas enfermidades na pecuária.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da portaria nº49 (BRASIL, 1997) regulamenta a produção, controle e emprego das vacinas veterinárias para *C. chauvoei*, quanto a sua esterilidade, inocuidade e eficiência em cobaios (*guinea pigs*) empregando a cepa oficial *C. chauvoei* MT (Manguinhos e Teixeira) no teste de potência por desafio letal. Somente as vacinas aprovadas nos testes oficiais são liberadas para a comercialização, garantindo assim, a qualidade das mesmas (BRASIL, 1997).

O presente trabalho objetivou avaliar o teste de potência em camundongos da linhagem BALB/c desafiados com esporos de *C. chauvoei*, como alternativa ao uso de *guinea pigs*. Dessa forma, foram utilizados esporos produzidos *in-house* a partir da cepa padrão utilizada pelo MAPA para determinar a DL₁₀₀ e avaliar a suscetibilidade dos camundongos à doença.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo de *C. chauvoei* e obtenção dos esporos

O cultivo foi realizado em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 0,05% (m/v) de cloridrato de cisteína (BHI-cis), sob condições de anaerobiose a 37°C. Após 24 horas, o cultivo foi transferido para 250 mL de BHI-cis e mantido nas mesmas condições até ocorrer a esporulação, que levou aproximadamente 14 dias. A pureza do cultivo foi confirmada pela observação da morfologia das colônias em ágar sangue (incubado a 37 °C por 72 horas), bem como pelas colorações de Gram e verde malaquita. As suspensões de esporos foram obtidas após lavagem do cultivo com tampão PBS (*phosphate-buffer-saline*) por duas vezes, seguidas de centrifugação para concentrá-las 10 vezes. Em seguida, o *pellet* celular foi suspenso em BHI-cis contendo 20% de glicerol, e armazenado em alíquotas de 1 mL em criotubos a -80 °C, para posterior contagem de células viáveis (UFC/mL).

2.2. Determinação da dose mínima letal de esporos em camundongos

A cepa *C. chauvoei* MT (Manguinhos e Teixeira), proveniente do Laboratório Leivas Leite, foi utilizada nos experimentos para avaliação da dose mínima letal e no teste de desafio de camundongos. A metodologia oficial, padronizada pelo MAPA para cobaios (BRASIL, 1997), foi adaptada para experimentação com camundongos. Considerando as características corporais da espécie, a letalidade nos camundongos BALB/c foi avaliada por meio da inoculação intramuscular (IM) de 50 µL de uma solução contendo esporos de *C. chauvoei* MT (7×10^{11} UFC/mL), diluídos em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 7,5%.

Para determinar a suscetibilidade dos camundongos ao desafio letal, foi utilizada a suspensão de esporos de *C. chauvoei* MT com o objetivo de identificar a menor dose capaz de causar a morte de todos os animais do grupo (DML). Foram feitas diluições decimais da suspensão de esporos em PBS estéril. Um total de 24 camundongos BALB/c, divididos em 6 grupos de 4 animais cada, foram inoculados via intramuscular com 50 µL das seguintes diluições: 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:30.000 e 1:40.000. Os animais foram monitorados por 72 horas, e os óbitos foram registrados para o cálculo da DL₁₀₀.

2.3. Teste de potência vacinal para validação da DML

Após a determinação da DML para a suspensão de esporos produzida *in-house* e armazenada a -80 °C, foi conduzido um experimento para validação do teste de potência. A vacina comercial multivalente contra clostridioses (Resguard T/HB), fabricada pela empresa Vaxxinova e previamente submetida aos testes oficiais do MAPA, contendo antígenos de *C. chauvoei*, foi adquirida e utilizada como controle positivo no experimento de desafio letal com camundongos BALB/c. Como controle negativo, utilizou-se uma solução de PBS estéril.

Foram utilizados 20 camundongos (machos e fêmeas), distribuídos em 4 grupos de 5 animais cada. Dois grupos receberam, via subcutânea, 0,5 mL de vacina comercial, com a primeira dose administrada no dia 0 e a segunda no dia 21. Os outros dois grupos foram inoculados com 0,5 mL de solução estéril de PBS. No 36º dia, um grupo de cada tratamento foi desafiado com 1 DML da suspensão de esporos de *C. chauvoei*, enquanto os dois grupos restantes foram expostos a 5 DL₁₀₀. Os animais foram monitorados durante 72 horas para avaliar mortalidade e sinais clínicos (*end points*).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel conforme parecer nº 76/2022 (processo nº 23110.040813/2021-23).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da taxa de sobrevivência (Tabela 1) foi possível determinar a diluição de 1:5.000 da suspensão estoque de esporos de *C. chauvoei* (7×10^{11} UFC/ml) como a menor concentração capaz de causar a morte de todos animais do grupo, sendo essa diluição considerada como a DML para o experimento de desafio letal em camundongos.

Tabela 1. Resultado da taxa de sobrevivência dos animais desafiados para determinação da dose mínima letal com diferentes diluições da suspensão de esporos de *C. chauvoei* MT.

Diluições da suspensão de esporos de <i>C. chauvoei</i> MT	Taxa de sobrevivência (72 h pós desafio)
1:1000	0% (0/4)
1:5000	0% (0/4)
1:10000	50% (2/4)
1:20000	75% (3/4)
1:30000	100% (4/4)
1:40000	100% (4/4)

No experimento de validação do teste de potência em camundongos, os animais foram imunizados via subcutânea com 2 doses (dias 0 e 21) e desafiados com 1 DL₁₀₀ e 5 DL₁₀₀ da suspensão de esporos *C. chauvoei* 15 dias após a administração da segunda dose, sendo os resultados de sobrevivência apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado de taxa de sobrevivência dos animais vacinados mediante teste de desafio letal (1 e 5 DML) com esporos de *C. chauvoei* MT (7×10^{11} UFC/ml).

Vacinas	Desafio com suspensão de esporos <i>C. chauvoei</i> MT	Sobrevivência (%)		
		24 h	48 h	72 h
Vacina comercial	1 DML (Diluição 1:5000)	5/5	5/5	5/5 (100%)
Controle PBS		5/5	5/5	0/5 (0%)
Vacina comercial	5 DML (Diluição 1:1000)	5/5	5/5	5/5 (100%)
Controle PBS		5/5	0/5	0/5 (0%)

Os animais que receberam a vacina comercial e foram desafiados com 1 DML e 5 DML da suspensão de esporos de *C. chauvoei* não demonstraram quaisquer sinais da doença, o que confirma a eficácia da vacina comercial. A taxa de sobrevivência dos camundongos BALB/c vacinados com a vacina comercial foi de 100% em ambos os grupos vacinados. Por outro lado, os animais do grupo controle, que receberam uma solução de PBS, não sobreviveram ao desafio quando acompanhados por 72 h.

Apesar do crescente apelo pela redução de estudos *in vivo*, os modelos animais ainda são os mais confiáveis para avaliar a resposta imunológica protetora (ZIECH et al., 2019). Os testes de desafio letal em cobaias e os ensaios de

soroneutralização em camundongos com cepas patogênicas de *Clostridium* spp. são amplamente utilizados nos testes oficiais do MAPA para avaliar a qualidade e a eficácia das vacinas comerciais que contêm antígenos de *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens* e *C. chauvoei* produzidas no Brasil (BRASIL, 1997).

O uso de camundongos como alternativa aos cobaias é fundamentado em aspectos éticos, maior disponibilidade de linhagens nos biotérios e menor custo devido à alta taxa reprodutiva, pequeno porte e facilidade no manejo e manutenção dos animais (RÊGO et al. 2019).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível estabelecer a diluição de 1:5.000 da suspensão de esporos de *C. chauvoei* como a dose mínima letal (DML) para camundongos BALB/c, permitindo a realização dos testes de potência. O experimento de vacinação demonstrou que a vacina comercial multivalente contra clostridioses foi eficaz na proteção dos animais, com 100% de sobrevivência nos grupos desafiados com 1 DL₁₀₀ e 5 DL₁₀₀ da suspensão de esporos. Esses resultados reforçam a capacidade da vacina de induzir imunoproteção e a importância do uso de modelos animais para avaliação de eficácia vacinal, apesar das discussões sobre a redução do uso de estudos *in vivo*. A metodologia estabelecida contribui para a validação de vacinas contra clostridioses e pode ser aplicada em futuros estudos para o desenvolvimento de imunobiológicos mais seguros e eficazes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, Guilherme Guerra et al. **Produção e purificação de toxinas e antitoxinas clostridiais**. 2017.
- ASSIS, R. A. DE. et al.. **Surto de carbúnculo sintomático em bezerros**. *Ciência Rural*, v. 35, n. 4, p. 945–947, jul. 2005.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura**. Portaria n. 49, de 12 de maio de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p. 10168-10169.
- GOMES, Marcos JP. **Gênero *Clostridium* spp.** Porto Alegre: Favet-UFRGS, 2013. p. 1-67.
- HATHEWAY, C. L. **Toxigenic clostridia**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 1, p. 66–98, 1990.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A. et al. **Clostridioses dos animais de produção**. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, p. 29–48, 2013.
- RÊGO, Jalison Figueredo do et al. **Ética e bem-estar em animais de laboratório**. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, p. 69-76, 2019.
- VARGAS, A. C. **Infecção mortal**. *Revista Cultivar Bovinos*, n. 19, jun. 2005.
- ZIECH, Rosangela Estel et al. **Eficácia protetiva de vacinas comerciais contra uma cepa de campo virulenta de *Clostridium chauvoei***. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, n. 5, p. 1837-1848, 2019.
- UZAL, Francisco A. **Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle**. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 28, n. 1, p. 71-77, 2012.