

SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/c AO DESAFIO DIRETO COM ESPOROS DE *Clostridium haemolyticum*

PEDRO HENRIQUE D.N. QUATRIN¹; MARILIANA LUIZA F. ALVES²; MARCOS ROBERTO A. FERREIRA³; FABRICIO R. CONCEIÇÃO⁴; ANGELA N. MOREIRA⁵

¹ UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – quatrinp@gmail.com

² INSTITUTO FEDERAL SUL-RIO-GRANDENSE-IFSul - luizamariliana@gmail.com

³ UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL - marcosferreiravet@gmail.com

⁴ UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL - fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

⁵ UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-UFPEL – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium haemolyticum é o agente causador da hemoglobinúria bacilar, uma doença hepatonecrótica fatal que acomete principalmente bovinos (LAGNEAUX et al., 2021). Nos ambientes de criação, a maior incidência dessa clostridiose está relacionada à presença de fatores predisponentes, tais como co-infecção com outros patógenos (UZAL et al., 2016). No Brasil, diversos trabalhos reportam a ocorrência de surtos na região sul do país (ESTIMA-SILVA et al., 2016; NAVARRO et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

O principal método de prevenção e controle do patógeno é a vacinação sistemática dos rebanhos e a formulação vacinal é baseada na obtenção de altas concentrações de toxina beta (ZARAGOZA et al., 2019). Entretanto, os níveis de anticorpos anti-toxina beta diminuem rapidamente 90 dias após a vacinação (ROSSI et al., 2018; TIZARD, 2021) e estudos que abordem a otimização ou o desenvolvimento de antígenos mais eficientes são indispensáveis (BOKORI-BROWN et al., 2014; KARCZEWSKI et al., 2014).

A principal diretriz que guia a avaliação do potencial de proteção das vacinas contra *C. haemolyticum* é o Código de Regulamentos Federais dos Estados Unidos (CFR-9) que preconiza a avaliação da proteção vacinal por desafio direto de cobaias com suspensão de esporos. Entretanto, o uso de cobaias frequentemente se mostra inviável (WEBSTER; FRANK, 1985) e uma alternativa regularmente utilizada nos estudos de doenças clostridiais são camundongos da linhagem BALB/c (ALIMOLAEI et al., 2021), os quais são de fácil manuseio e apresentam características específicas para experimentos no âmbito da imunologia (POTTER, 2012). Assim, considerando a importância deste patógeno na pecuária e a necessidade de desenvolver e avaliar novas vacinas em instituições que carecem de cobaias para testes animais, o presente estudo avaliou a suscetibilidade de camundongos BALB/c ao desafio direto com esporos de *C. haemolyticum*.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção de esporos

A suspensão de esporos de *C. haemolyticum* para o desafio foi preparada conforme instruções dos fabricantes (USDA, EUA). Segundo o protocolo oficial, a dose letal capaz de causar a morte de 50% dos cobaias em avaliação (1 DL50) equivale a 500 µL da suspensão de esporos IRP526 diluída (1:400.000) em cloreto de cálcio (CaCl₂·2H₂O) 7,5% e inoculada por via intramuscular (IM). Neste trabalho, considerando a metodologia de preparo preconizada e o porte corporal

dos camundongos, a solução de esporos IRP foi diluída nas concentrações de 1:4000, 1:2000 e 1:1000 e uma dose de 50 µL foi inoculada por via IM. A suspensão foi preparada cerca de 10 a 15 minutos antes do teste de desafio e mantida em banho de gelo até o uso.

2.2. Cultivo de *C. haemolyticum* e obtenção de beta toxina

Para quebra da dormência, 200 µL da suspensão de esporos (IRP 526-06) foi submetida a um choque térmico (80°C por 10 min, seguido de 5 min em banho de gelo), transferida para 10 mL de meio Brain Heart Infusion suplementado com 0,05% (m/v) de cloridrato de cisteína (BHIc) e cultivada sob condições anaeróbias (37°C). Após 48 h, o cultivo foi transferido para 90 mL de meio BHIc e cultivado anaerobicamente até a esporulação (37°C, cerca de 5 dias). A pureza e a esporulação do meio foram verificadas pela morfologia das colônias em ágar sangue (37°C/72h), coloração de Gram das células germinativas no início do cultivo e coloração com verde malaquita (OLIVEIRA, 2000). Os esporos obtidos foram então lavados duas vezes com solução de PBS (*phosphate-buffered-saline*), concentrado 10x com BHIc em meio crioprotetor (ELLNER, 1978) e liofilizados em frascos com 3 mL da suspensão de esporos.

Para produção da beta toxina (42,9 kDa), a metodologia proposta por SCHALLEHN & EKLUND (1980) e DARAKHSHAN & LAUERMAN (1981) foi adaptada. Em suma, um pré inóculo de 100 mL (37° C/ 24h sob anaerobiose) obtido a partir da ativação da alíquota liofilizada foi transferido para 500 mL de meio BHIc (10% v/v) e mantido em anaerobiose (48h a 37°C). Após verificar a ausência de contaminação (coloração de Gram), o cultivo foi centrifugado (8000 × g por 5 minutos) e o sobrenadante concentrado 12x por ultrafiltração com membrana de retenção de 30 kDa (AMICON-MILIPORE CORPORATION, USA). A presença da beta toxina foi determinada por testes *in vitro* de fosfolipase (ZHAO et al., 2011).

No teste de susceptibilidade de camundongos à beta toxina, 300 µL de diferentes diluições do sobrenadante concentrado (Figura 2) foram inoculados por via intraperitoneal (IP) e PBS estéril foi utilizado como solução diluente.

2.3. Avaliação da susceptibilidade de camundongos BALB/c à *Clostridium haemolyticum*

Trinta camundongos BALB/c (machos e fêmeas, 4 a 6 semanas) foram inoculados com diferentes diluições da suspensão de esporos ou da beta toxina de *C. haemolyticum*. Foram utilizados 3 animais para cada diluição avaliada. Dois animais receberam apenas solução de cloreto de cálcio (50 µL) ou meio BHIc concentrado (300 µL), por IM e IP, respectivamente. Os animais foram observados quanto à morte ou sinais clínicos por até 60 dias. Ao final do experimento, os sobreviventes sofreram eutanásia com sobredosagem do anestésico cetamina-xilazina (30 e 10 mg/kg, respectivamente).

Este estudo foi conduzido de acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (Parecer nº 9286).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência nos animais desafiados com suspensão de esporos foi de 100% em todas as diluições avaliadas. Contudo, nos locais de inoculação foram observados abscessos cutâneos, lesões necróticas e bacilos

Gram-positivos (Figura 1A e B) indicando, portanto, uma resposta imune modulada pelo animal e a germinação dos esporos no local. Nos testes seguintes, a alta taxa de mortalidade (Figura 2) e o aspecto hemolítico do fígado dos animais inoculados com a beta toxina indicaram que esta espécie é suscetível aos efeitos letais dessa fosfolipase. Em geral, os animais apresentavam apatia seguida de morte ainda nas primeiras 24 h após a inoculação da toxina (Figura 2).

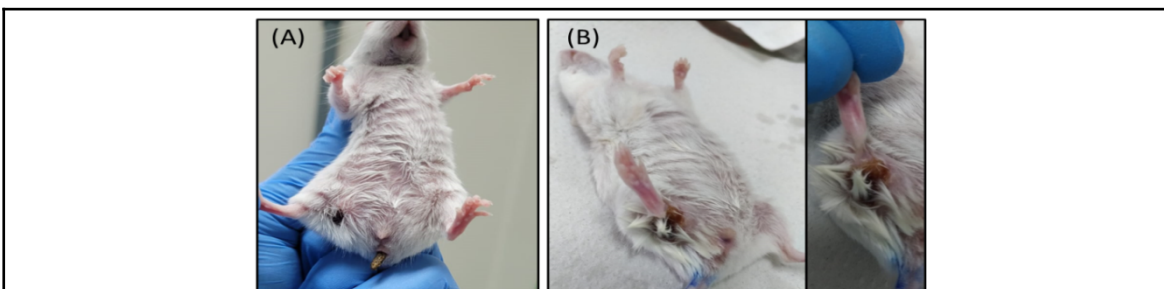


Figura 1. Lesões de camundongos BALB/c desafiados com suspensão de esporos de *Clostridium haemolyticum* (diluição 1:1000) após 3 (A) e 6 dias (B).

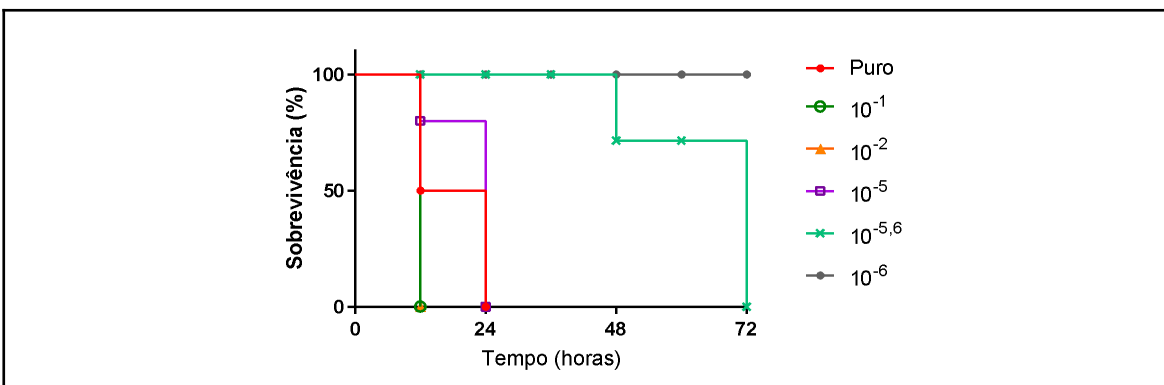


Figura 2. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c ao teste de suscetibilidade à beta toxina de *Clostridium haemolyticum*.

Uma vez que os camundongos são suscetíveis a ação hemolítica do principal fator de virulência produzido por *C. haemolyticum* e os esporos foram capazes de germinar e causar lesões teciduais, é possível considerar que a produção de quantidades letais da toxina a partir das células germinativas tenha sido limitada pela resposta imune modulada pelo indivíduo. Portanto, uma hipótese a ser considerada é a influência da concentração de esporos na dose inoculada, já que o maior número de esporos poderia provocar uma reação mais promissora do sistema imune inato do hospedeiro e, conseqüentemente, a inviabilização da germinação e produção de quantidades letais da toxina (SCHOEPE et al., 2006; BERNHEIMER, 1944). Nos ambientes de criação, a ocorrência de hemoglobinúria bacilar está frequentemente relacionada a um fator predisponente que viabiliza a germinação do patógeno (ALVES et al., 2022).

Por fim, considerando as taxas de morte e sobrevivência, respectivamente, nas diluições $\leq 1:32$ (10^{-5}) e $> 1:64$ (10^{-6}), uma diluição intermediária (1:48 ou $10^{-5,6}$) foi avaliada a fim de aumentar a resolução da dose letal mínima (DLM). Na diluição intermediária (1:48), 6,25 μ L da beta toxina concentrada ocasionou a morte de 100% dos animais em 72 h (Figura 1). Todos os animais do grupo controle sobreviveram ao teste e nenhum sintoma ou lesão que pudesse comprometer o organismo ou causar morte foi observado.

4. CONCLUSÕES

Embora não sejam susceptíveis à ação dos esporos, camundongos BALB/c são sensíveis à ação hepatonecrosante da beta toxina produzida por *C. haemolyticum*. Portanto, uma vez que este é o principal fator de virulência do patógeno, é possível admitir que estudos futuros usem camundongos BALB/c como modelo experimental nos testes de desafio letal durante o desenvolvimento de vacinas. Contudo, a avaliação em cobaias ainda deve ser priorizada para validação final do produto. Além de avaliar a suscetibilidade de camundongos BALB/c à ação da beta toxina, este trabalho também divulga um método de produção de beta toxina e guia o pesquisador sobre quais diluições devem ser consideradas para determinar a DLM dos testes de desafio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIMOLAEI, M.; GOLCHIN, M.; BALUCH-AKBARI, A. Immunogenicity of a recombinant *Lactobacillus casei*, surface-expressed H151P mutant of *Clostridium perfringens* epsilon toxin and its protective responses in BALB/c mice. **Toxicon**, v. 200, p. 173-179, 2021.
- LAGNEAUX, A. S. et al. *Clostridium Haemolyticum* Infection: A Cause of Hemolytic Anemia in a Patient With Bone Marrow Necrosis. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1568, 2021.
- ESTIMA-SILVA, P. et al. Morte súbita em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 19-23, 2016.
- UZAL, F. A. et al. (Ed.). **Clostridial diseases of animals**. John Wiley & Sons, 2016.
- ZARAGOZA, N. E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.
- TIZARD, I. R. Sheep and goat vaccines. **Vaccines for Veterinarians**, p. 215, 2021.
- BOKORI-BROWN, M. et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia. **Vaccine**, v. 32, n. 23, p. 2682-2687, 2014.
- KARCZEWSKI, J. et al. Development of a recombinant toxin fragment vaccine for *Clostridium difficile* infection. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2812-2818, 2014.
- WEBSTER, A. C.; FRANK, C. L. Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multi-component clostridial vaccines. **Australian veterinary journal**, v. 62, n. 4, p. 112-114, 1985.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE <http://www.usda.gov>
- ELLNER, P. D. **Current Procedures in Clinical Bacteriology**. 1.ed. Springfield: Charles Thomas, 1978. 223p
- SCHALLEHN, G.; EKLUND, M. W. Conversion of *Clostridium novyi* type D (*C. haemolyticum*) to alpha toxin production by phages of *C. novyi* type A. **FEMS Microbiology Letters**, v. 7, n. 2, p. 83-86, 1980.
- DARAKHSAN, H.; LAUERMAN, L. H. Some properties of beta toxin produced by *Clostridium haemolyticum* strain IRP-135. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 3-4, p. 307-316, 1981.
- ALVES, M. L. F. et al. *Clostridium haemolyticum*, a review of beta toxin and insights into the antigen design for vaccine development. **Molecular Immunology**, v. 148, p. 45-53, 2022.
- POTTER, M. (Ed.). **The BALB/c mouse: genetics and immunology**. Springer Science & Business Media, 2012.
- BERNHEIMER, A. W. Parallelism in the lethal and hemolytic activity of the toxin of *Clostridium septicum*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 80, n. 4, p. 309-320, 1944.
- ROSSI, A. et al. Temporal evolution of anti-*Clostridium* antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccines. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 202, p. 46-51, 2018.
- SANTOS, B. L. et al. Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil. A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 435-446, 2019.
- NAVARRO, M. A. et al. Pathology of naturally occurring bacillary hemoglobinuria in cattle. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 3, p. 457-466, 2017.