

INFLUÊNCIA DO USO DA ASSOCIAÇÃO DA XILAZINA E QUETAMINA EM *Cavia porcellus*, NA POTÊNCIA DE TOXINAS BOTULÍNICAS NA SORO NEUTRALIZAÇÃO

(*Influence of the use of xylazine and ketamine association in Cavia porcellus on the
potency of botulinum toxins and d in serum neutralization*)

Anderson Silva DIAS¹; Alexandre Gualberto PENNA¹; Gabriel Augusto
Oliveira LOPES¹; George Afonso Vitor CALDEIRA¹

¹Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Laboratório
de Controle de Produtos Biológicos; Av. Rômulo Joviano, s/n. Pedro Leopoldo, MG,
CEP: 30.360-000. E-mail: anderson.dias@agricultura.gov.br

RESUMO

O botulismo é uma zoonose causada pelas neurotoxinas produzidas por *Clostridium botulinum*. Existem oito variedades de toxinas (A-H), as toxinas C e D são as principais responsáveis por prejuízos na bovinocultura, causando óbito. Dentre as medidas preventivas eficientes, destaca-se a vacinação dos animais. Uma metodologia padrão para medir a eficiência de uma vacina é a soroneutralização *in vitro* tendo camundongos como sistema indicador. O objetivo do trabalho foi verificar a interferência do uso de anestésicos em *Cavia porcellus* vacinados sobre o efeito protetor dos soros, quando realizada a coleta de sangue para realizar a soroneutralização frente às toxinas padrões C e D. Neste trabalho foram realizados procedimentos de vacinação subcutânea, na região laterodorsal de *Cavia porcellus*, na dose de 5 ml no primeiro dia e repetição após 21 dias, e sangria após mais 21 dias. Foram formados dois grupos de 10 animais para cada amostra vacinal, um para sangria com o uso de associação anestésica (cloridrato de xilazina 2%, 5mg/Kg/IM e cloridrato de quetamina 10%, 25mg/Kg/IM) e outro sem uso, após isso submeteu-se o pool de soro coletado de cada grupo à soroneutralização *in vitro* com toxinas padrões C e D. Esses procedimentos de validação possibilitarão o seu emprego visando o bem-estar animal nos testes de controle de qualidade de vacinas. Foi observado que a aplicação de anestésicos para a punção cardíaca não interferiu no nível de proteção dos soros dos animais frente ao desafio de toxinas C e D, comparado aos não anestesiados.

Palavras-chave: Botulismo, vacinas, bovinos, toxinas botulínicas, associação anestésica, soro neutralização.

ABSTRACT

Botulism is a zoonosis caused by neurotoxins produced by *Clostridium botulinum*. There are eight varieties of toxins (A-H), toxins C and D are main responsible for illness in cattle, causing death. Among the effective preventive measures, the vaccination of the animals stands out. To ensure adequate protection of animals, vaccines must be efficient. A standard methodology for measuring the efficiency of a vaccine is *in vitro* serum neutralization having mice as the indicator system. The objective of the study was to verify the interference of anesthetic use in vaccinated guinea pigs on the protective effect of sera when blood collection was performed to perform serum neutralization against standard C and D toxins. In this work, subcutaneous vaccination procedures were performed in the

later dorsal region of guinea pigs at the dose of 5 ml on the first day and repetition after 21 days and bleeding after another 21 days. Two groups of 10 animals were formed for each sample de vaccine, one for bleeding with the use of an anesthetic association (xylazine hydrochloride 2%, 5mg/Kg/IM and ketamine hydrochloride 10%, 25mg/Kg/IM) and the other with no use, after which the serum mixture collected from each group were submitted to in vitro serum neutralization with standard C and D toxins. This validation study will make it possible to introduce the use this procedures aimed at animal welfare in the quality control tests of vaccines. It was observed that the application of anesthetics to cardiac puncture did not interfere in the level of protection of the sera of the animals against the challenge of toxins C and D compared to those obtained of not anesthetized animals.

Keywords: Botulism, vaccines, cattle, botulinum toxins, anesthetic association, serum neutralization.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma enfermidade causada por neurotoxinas que induzem a paralisia muscular produzidas por *Clostridium botulinum* que afeta o homem e animais (LOBATO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016). Esses agentes são responsáveis por sérios prejuízos à pecuária bovina (DUTRA *et al.*, 2001; STEINMAN *et al.*, 2006; CURCI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016). As toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* são responsáveis por surtos que geralmente culminam em óbito associado à osteofagia nesses animais (LOBATO, 1998; DÖBEREINER *et al.*, 1992; DUTRA *et al.*, 2001) e à veiculação hídrica e de alimentos contaminados (DUTRA *et al.*, 2001; KRÜGER *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de dois milhões de bovinos obtiveram óbito entre 1970 e 1990 com suspeita de botulismo (CARCIOLI *et al.*, 2003). Atualmente, o botulismo figura entre os principais agentes causadores de óbito no Brasil em bovinos (RAYMUNDO *et al.*, 2014). Salvarani *et al.* (2017) relatam que o botulismo é a maior causa de morte em bovinos adultos no Brasil.

Uma das medidas para o controle dessa enfermidade nesses animais é a vacinação (LOBATO, 1989; STEIMANN *et al.*, 2006; LOBATO *et al.*, 2013). Dutra e Döbereiner (1996), no Estado do Rio de Janeiro, verificaram em um ensaio experimental a campo, que entre grupos com o mesmo número de indivíduos, sendo um de bovinos vacinados, onde houve apenas um óbito por botulismo e dentre o outro grupo com bovinos não vacinados que verificou-se 31 óbitos, evidenciou-se a eficácia de se vacinar esses animais na prática. Para uma imunização eficaz deve-se assegurar que a vacina utilizada deve ser conservada em temperatura adequada. Vacinas eficientes devem ser testadas e aprovadas no teste de controle de qualidade antes de serem destinadas para o uso (BRASIL, 1997; SILVA *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2006; CURCI *et al.*, 2013). Dentre os parâmetros indicativos da qualidade das vacinas contra o botulismo, está o estudo das potências das toxinas botulínicas C e D, agentes importantes nas casuísticas de mortalidade e morbidade de ruminantes à campo (JANSEN, 1971; STEINMAN *et al.*, 2006).

Assim, o controle de qualidade das vacinas botulínicas possui um importante papel para a garantia da sanidade do rebanho bovino (DUTRA e DÖBEREINER, 1995; CURCI *et al.*, 2013). Um método universal e padrão ouro para se saber a eficácia é a soroneutralização *in vitro* (JANSEN, 1971; SMITH, 1977), na qual se utiliza camundongos

como sistema indicador e os soros, geralmente, são obtidos de cobaios vacinados. O uso de anestésicos para a sangria dos cobaios tem sido considerado um evento crucial no tocante ao que visa o bem-estar animal (LAPCHIK *et al.*, 2010). Não tem sido reportada qual a interferência do uso do anestésico nos soros oriundos de animais sangrados, nos quais se usam os soros para verificar a capacidade de neutralizar uma toxina padrão.

O emprego de anestésico para realizar a sangria desses animais experimentais poderia determinar alterações sorológicas responsáveis por alterar a soroneutralização *in vitro* de imunoglobulinas. Sabe-se que o uso de medicamento pode ser responsável por resultar em anafilaxia (KUMAR *et al.*, 2002).

O objetivo do presente estudo foi verificar a interferência do uso de associação anestésica em *Cavia porcellus* vacinados, quando realizada a coleta de sangue (soro) para realizar a soro neutralização frente às toxinas padrões C e D, verificando a interferência do efeito protetor dos soros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios preconizados por este estudo foram realizados no Laboratório de Controle de Produtos Biológicos, do Laboratório Nacional Agropecuário (MG) em 2015, que são responsáveis pelos testes de potência de vacinas botulínica toxoides tipo C e D (BRASIL, 1997). Esse teste utiliza dez cobaios por grupo com peso 400 ± 50 g, que são vacinados no dia zero e no vigésimo primeiro dia, e sangrados após 21 dias por punção cardíaca, a seguir, o sangue coletado é centrifugado a 1000g por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (BRASIL, 1997). Para esse ensaio um grupo de cobaios foram puncionados com insensibilização, com solução de cloridrato de xilazina 2%, 5mg/Kg/IM (Xilazin[®]) e cloridrato de quetamina 10%, 25mg/Kg/IM (Cetamin[®]), protocolo anestésico de Lapchik *et al.* (2010) e o outro grupo foi puncionado sem o emprego do anestésico, esses animais receberam a mesma dose da mesma partida da vacina a ser testada. A Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016, do Conselho Nacional de Experimentação Animal, não permite mais a punção cardíaca sem prévia indução anestésica. Entretanto, o presente trabalho de experimentação foi realizado no ano de 2015, visando adequar os procedimentos de que o uso de associação anestésica não iria interferir no resultado da soro neutralização *in vitro*, portanto é anterior à resolução acima citada.

Essas amostras de soros foram empregadas na soro neutralização *in vitro*, que consistiu em desafiar o *pool* (utilizou-se 0,5 mL de soro de cada animal) do soro de dez cobaios vacinados com toxinas botulínicas C e D padronizadas e produzidas por *Clostridium botulinum* (LANAGRO/MG) em diluições dos soros em 1:2 e 1:5 (Tab. 1 e 2), essa mistura de soro, toxina e diluente, solução salina peptonada 0,25 % de NaCL e 1% de peptona, são misturadas em tubo de ensaio com agitador tipo *vortex* e mantida por 1 hora em banho maria (37 ± 1 °C).

Tabela 1: Esquema de diluição do soro em teste para a verificação da titulação de antitoxina botulínica tipo C.

Reagentes (mL)	Antitoxinas C (UI/mL)	
	2	5

Soro teste	0,5	0,2
Diluyente	0,5	0,8
Toxina	1,0	1,0

Foi reconstituído e diluído a toxina de modo a obter uma concentração de 1L+/mL (L+ é a quantidade de toxina que neutralizada frente a 1 UI de antitoxina por ml é ainda capaz de matar os animais desafiados), em volume suficiente para o teste.

Tabela 2: Esquema de diluição do soro em teste para a verificação da titulação de antitoxina botulínica tipo D.

Reagentes (mL)	Antitoxinas D (UI/mL)	
	1	2
Soro teste	1,0	0,5
Diluyente	-	0,5
Toxina	1,0	1,0

Após isso, dois camundongos com peso de 20±2g foram inoculados com 0,2 ml de cada diluição do soro, por via endovenosa. Os camundongos inoculados foram observados por 72 horas. Os animais sobreviventes após o término do teste foram sacrificados em câmara de CO₂.

Foram avaliadas as amostras de soros quanto à presença de níveis mínimos de 5 UI/ml para a toxina C e 2 UI/mL para a toxina D.

Para o controle da técnica, foram utilizados as toxinas e antitoxinas C e D padrões que foram neutralizadas *in vitro* e testadas nos camundongos, em diluições 1:2 e 1:5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi verificado durante e após os procedimentos de anestesia com cloridrato de quetamina, com cloridrato de xilazina e sangria, animais que apresentassem quaisquer alterações adversas ou reações anafiláticas ou alérgicas, sendo verificado que os mesmos se apresentavam normais, e algumas horas após o procedimento de sangria retornaram a moverem-se normalmente, se alimentarem e ingerirem água. De acordo com Kumar *et al* (2002), as possibilidades de ocorrer choques anafiláticos são consideráveis.

Os resultados da soro neutralização (vida ou morte), de dois camundongos por diluição, apontam as concentrações que determinam se as vacinas comerciais possuem ou não quantidade suficiente de imunógeno, para induzir o animal a produzir quantidade suficiente de anticorpo protetor. Aqui foram comparados os resultados dessas vacinas obtidas do grupo de cobaios vacinados, que não receberam aplicação de associação anestésica e de animais que não foram anestesiados na contenção, para realizar a punção cardíaca desses animais.

Os resultados da soro neutralização estão representados para grupos de animais anestesiados na contenção e animais contidos sem anestesia (Quadros 1 e 2).

Quadro 1: Resultado da soro neutralização de vacinas contra botulismo (Toxina C de *Clostridium botulinum*) dos grupos de cobaias anestesiados.

Amostras	Uso de anestésicos	Data de Sangria	Diluição	Toxina C
CPB/2015/0224	NÃO	20/08/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0224 A	SIM	20/08/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0239	NÃO	20/08/2016	1:2	++
			1:5	++
CPB/2015/0239 A	SIM	20/08/2015	1:2	++
			1:5	++
CPB/2015/0298	NÃO	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0298 A	SIM	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0313	NÃO	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0313 A	SIM	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0317	NÃO	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0317 A	SIM	22/10/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0343	NÃO	26/11/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0343 A	SIM	26/11/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0347	NÃO	26/11/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0347 A	SIM	26/11/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0381	NÃO	17/12/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0382 A	SIM	17/12/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0384	NÃO	17/12/2015	1:2	vv
			1:5	vv
CPB/2015/0384 A	SIM	17/12/2015	1:2	vv
			1:5	vv

Obs. Procedimentos visando realizar a punção cardíaca de animais não anestesiados.

Quadro 2: Resultado da soro neutralização de vacinas contra botulismo (Toxina D de *Clostridium botulinum*) dos grupos de cobaias anestesiados.

Amostras	Uso de anestésicos	Data de Sangria	Diluição	Toxina D
CPB/2015/0224	NÃO	20/08/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0224 A	SIM	20/08/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0239	NÃO	20/08/2016	1:1	++
			1:2	++
CPB/2015/0239 A	SIM	20/08/2015	1:1	++
			1:2	++

CPB/2015/0298	NÃO	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0298 A	SIM	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0313	NÃO	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0313 A	SIM	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0317	NÃO	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0317 A	SIM	22/10/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0343	NÃO	26/11/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0343 A	SIM	26/11/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0347	NÃO	26/11/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0347 A	SIM	26/11/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0381	NÃO	17/12/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0382 A	SIM	17/12/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0384	NÃO	17/12/2015	1:1	vv
			1:2	vv
CPB/2015/0384 A	SIM	17/12/2015	1:1	vv
			1:2	vv

Obs. Procedimentos visando realizar a punção cardíaca de animais não anestesiados.

Verificou-se que o emprego de anestésicos antes da realização da punção cardíaca, visando uma coleta sanguínea para obtenção do soro teste, não apresentou interferência nos resultados de soroneutralização quando comparado à grupo de animais que não sofreram anestesia para realizar essa punção. Portanto, o uso de associação anestésica (cloridrato quetamina, 25mg/Kg/IM, 10% e cloridrato de xilazina, 5mg/Kg/IM, de xilazina, 2%), com aplicação realizada trinta minutos antes da sangria nas concentrações recomendadas pelo protocolo de Lapchik *et al.* (2010), não apresentou interferência no resultado da soro-neutralização de toxinas frente aos soros testados quando comparado aos procedimentos realizados sem o emprego do protocolo anestésico. Essas comprovações contribuirão para a garantia do bem-estar dos animais destinados a esses ensaios. As vacinas contra botulismo poderão ser testadas quanto à sua eficiência de forma humanitária nos animais de laboratório sem interferir nos resultados.

REFERÊNCIAS

- BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. Doenças do Sistema nervoso de bovinos no Brasil. AGNS Gráfica e Editora, São Paulo. 2006. 207p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 49, 12 de maio de 1997. Diário Oficial da União, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169, 1997.

- CARCIOFI, A.C.; MARQUES, L.C.; PRADA, F.; SCHOCKEN-LTURRINO, R.P.; ALESSI, A.C. Estudo etiológico e epidemiológico da “doença da vaca caída”. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia (CRMV-SP), v.6, n.1, 3, p.28-41, 2003.
- CURCI, V.C.M.; ZOCOLLER-SENO, M.C.; NOGUEIRA, A.H.C.; ARAUJO, R.F.; CARDOSO, T.C.; DUTRA, I.S. Resposta humoral de bovinos vacinados contra as toxinas botulínicas tipos C e D em diferentes faixas etárias. Arquivo do Instituto Biológico, v.80, n.1, p.99-102, 2013.
- DÖBEREINER, J.; LANGENEGGER, J.; TOKARNIA, C.H.; DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. Deutsche Tierärztliche Wochenscher, v.99, n.5, p.88-190, 1992.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a “doença da vaca caída”: botulismo. A Hora Veterinária, v.84, n.1, p.7-10, 1995.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Eficácia da Vaxall – vacina botulínica bivalente – na prevenção do botulismo em bovinos. Hora Veterinária, v.16, n.93, p.22-26, 1996.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V.; SOUZA, L.A.A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos associados à ingestão de água contaminada. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.21, n.2, p.43-48, 2001.
- JANSEN, B.C. The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. Onderstepoort. Veterinary Research, v.38, n.2, p.93-98, 1971.
- KRÜGER, M.; NEUHAUS, J.; HERRENTHEY, A.G.; GÖKCE, M.M.; SCHRÖDL, W.; SHEHATA, A.A. Chronic botulism in a Saxony dairy farm: sources, predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities. Anaerobe, v.28, p.220-225, 2014.
- KUMAR, A.; SADHASIVAM, S.; SETHI, A.K. Anaesthesia - immune system interactions: implications for anaesthesiologists and current perspectives. Indian Journal of Anaesthesiology, v.46, n.1, p.8-20, 2002.
- LAPCHIK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. 1ª edição, São Paulo: Atheneu Editora. 2010. 736p.
- LOBATO, F.C.F.; SILVA, N.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V.; MAIA, J.D. Potência de toxoides botulínicos bivalentes C e D produzidos e comercializados no Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.20, p.35-38, 1998.
- LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; GONÇALVES, L.A.; PIRES, P.S.; SILVA, R.O.S.; ALVES, G.G.; NEVES, M.; OLIVEIRA JÚNIOR, C.A.; PEREIRA, P.L.L. Clostridioses dos animais de produção. Veterinaria & Zootecnia, v.20, p.29-48, 2013.
- RAYMUNDO, D.L.; BANDARRA, P.M.; BOABAID, F.M.; SONNE, L.; GOMES, D.C.; DRIEMEIER, D. Clostridial diseases diagnosed in herbivores in Southern Brazil. Acta Scientiae Veterinariae, v.42, n.1204, p.1-8, 2014.
- SALVARANI, F.M.; OTAKA, D.Y.; OLIVEIRA, C.M.C.; REIS, A.S.B.; PERDIGÃO, H.H.; SOUZA, A.E.C.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D. Surtos de botulismo hídrico tipo C em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região amazônica. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.37, n.7, p.697-700, 2017.
- SILVA, R.O.S.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; GONÇALVES, L.A.; LOBATO, F.C.F. Botulism in ruminants in Brazil. Ciência Rural, v.46, n.8, p.1411-1417, 2016.

SILVA, T.M.D.; DUTRA, I.S.; CASTRO, R.N.; DÖBEREINER, J. Ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.18, n.3-4, p.127-131, 1998.

SMITH, L.D. Botulism: the organism, its toxins, the disease. Springfield: Charles C. Thomas. 1977. 236 p.

STEINMAN, A.; CHAFFER, M.; ELAD, D.; SHPIGEL, N.Y. Quantitative Analysis of Levels of Serum Immunoglobulin G against Botulinum Neurotoxin Type D and Association with Protection in Natural Outbreaks of Cattle Botulism. Clinical and Vaccine Immunology, v.13, n.8, p.862-868, 2006.