



T 636.089 69
L 864a
1977

AVALIAÇÃO DE IMUNÓGENOS ANTI-CARBÚNCULO SINTOMÁTICO, EM
USO NO BRASIL.

Tese apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Fe-
deral de Minas Gerais como par-
te dos requisitos para a obten-
ção do grau de Mestre em Medi-
cina Veterinária

(Área de Medicina Veterinária
Preventiva)

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITARIA



000464188801 OK

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA
ANTÔNIO DE ALMADA LOPES


Belo Horizonte - 1977

OK
02/03/04
06

Tese aprovada em: 13/10/77.

Banca Examinadora:


Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO


Prof. RONALDO REIS


Prof. FRANCISCO CECÍLIO VIANA

Aos meus pais, à minha
esposa e aos meus filhos,
que sempre foram fonte do
entusiasmo e motivo da fe-
licidade em minha vida, de-
dico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. José Britto Figueiredo a sábia e amiga orientação na realização deste trabalho.

Agradeço, também, a todos aqueles que de alguma maneira nos deram sua contribuição:

- Professores e funcionários da Escola de Veterinária da U.F.M.G.

- Professores e funcionários da Escola Média de Agricultura de Florestal da U.F.V.

- Instituto Biológico de São Paulo, Laboratório Fama Ltda., Laboratório Hertape e Pfizer Química Ltda.

- Técnicos e auxiliares do Ministério da Agricultura.

- Dr. Cássio Malheiros - Centro de Profilaxia da Raiva - Prefeitura de Belo Horizonte.

- Professor Luiz Maria de Moura, ex-Diretor da Escola Média de Agricultura de Florestal.

- Professora Dora de Melo Machado.

- Professor Juarez Ferreira dos Santos, Diretor da Escola Média de Agricultura de Florestal.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Agradeço, em especial, a Carl Zeiss, Oberkhen, W.G., tanto a colaboração técnica como para a impressão deste trabalho.

CONTEÚDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	5
3. MATERIAL	13
4. MÉTODOS	16
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	50
8. SUMÁRIO	52
9. SUMMARY	54
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56



ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Enfermidade	1
1.2. Justificativas	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Avaliação de Imunógenos	4
1.3.2. Substituição de Cobaicos por Camun- dongos	4
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	5
2.1. Imunógenos	5
2.2. Provas de Avaliação	10

	<u>Página</u>
5.1.3.2. Avaliação das Bacterinas- Padrão em Cobaias	26
5.1.3.3. Avaliação das Bacterinas- Padrão em Camundongos:	
a) Determinação da DL100 das Amostras-Desafio ..	28
b) Determinação da DP 50 das Bacterinas-Padrão..	29
5.1.3.4. Avaliação da Proteção An- ti- <u>C. chauvoei</u> dos Imunóge nos Comerciais	32
5.1.3.5. Avaliação da Proteção An- ti- <u>C. septicum</u> dos Imunóge nos Comerciais	34
5.2. Substituição de Cobaios por Camundongos nas Provas de Proteção	35
6. DISCUSSÃO	36
6.1. Padrão de Referência	36
6.1.1. Preparo das Bacterinas	39
6.1.2. Provas de Controle	40
6.2. Bacterinas Comerciais	43
6.2.1. Provas de Controle	44
6.2.1.1. Esterilidade	44
6.2.1.2. Inocuidade	44
6.2.1.3. Proteção	45

	<u>Página</u>
6.3. Substituição de Cobaios por Camundongos nas Provas de Proteção	48
7. CONCLUSÕES	50
8. SUMÁRIO	52
8.1. Esterilidade e Inocuidade	52
8.2. Avaliação de Proteção	53
8.3. Substituição de Cobaios por Camundongos ..	53
9. SUMMARY	54
9.1. Sterility and Innocuity	54
9.2. Potency Testing	55
9.3. Substitution of Guine Pigs for Mice	55
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Enfermidade

O Carbúnculo Sintomático é uma doença antiga, universal, que ocorre naturalmente em bovinos e ovinos, raramente em caprinos e suínos, podendo atingir outros animais, mesmo peixes. É causado pelo Clostridium chauvoei (Clostridium fesi) mas é freqüente o encontro de outros clostrídios patogênicos associados às lesões como Clostridium septicum, Clostridium novyi e Clostridium perfringens. O Clostridium sporogenes, geralmente considerado não patogênico, é citado por RYFF & LEE (1947) como tendo efeito sinérgico na infecção.

O Carbúnculo Sintomático não é uma doença contagiosa. É grave e aguda, tendo, por isso, causado perdas expressivas aos rebanhos de quase todo mundo. Atualmente

acha-se bem controlada, sendo a vacinação a principal medida profilática.

Os Clostridia são muito disseminados na natureza, principalmente no solo, concorrendo este fato para o encontro de associações freqüentes nas lesões clinicamente diagnosticadas como "Manqueira". Assim, Rodrigues (1939) encontrou:

Somente <u>C. chauvoei</u>	72%
<u>C. chauvoei</u> e <u>C. septicum</u>	11%
<u>C. chauvoei</u> , <u>C. septicum</u> e <u>C. perfringens</u> .	6%
Somente <u>C. perfringens</u>	4%
Não identificados	6%

BRAGA (1942), em trabalho relacionado também com a etiologia, registrou:

Somente <u>C. chauvoei</u>	84%
Associação de clostrídios	8%
Sem isolamentos	8%

Os clostrídios patogênicos podem também ser introduzidos no organismo, sem vir a causar transtornos imediatos. Assim, KERRY (1964) isolou o C. chauvoei do fígado e baço de 20% dos novilhos de dois anos, aparentemente normais, abatidos em matadouro.

Minet (s/d), citado por MÁRIO (1969), diz que o C. chauvoei, muito espalhado no solo onde se criam ruminantes, está sempre presente nos intestinos destes ani-

mais, podendo atingir a corrente circulatória e permanecer em estado latente na musculatura. Comprovou este facto inoculando animais com esporos lavados os quais não evoluíram e não produziram doença. A inoculação de cloreto de cálcio, no mesmo local, desencadeou a infecção.

1.2. Justificativas

As vacinas brasileiras contra o Carbúnculo Sintomático não são padronizadas. Há variações nas técnicas de preparo, como por exemplo, utilização não sistematizada de adjuvantes (hidróxido de alumínio, alúmen de potássio, saponina); o emprego de formol como esporicida e modificador de toxinas, em concentrações variáveis e a elaboração de vacinas a partir de culturas não tratadas por serem originadas de amostras não patogênicas. Variam, também, quanto à composição — mono ou polivalente, volume das doses, meio de cultivo e mesmo quanto às provas de controle.

Nos últimos anos tem ocorrido diagnóstico clínico de "Manqueira" — nome popular do Carbúnculo Sintomático — em animais vacinados, no Estado de Minas Gerais. Confirmações bacteriológicas foram obtidas nos laboratórios da Escola de Veterinária da U.F.M.G., FIGUEIREDO (1974).

As frequentes infecções a campo, pelo C.septicum sugerem sua inclusão nas vacinas contra "Manqueira". No

Brasil, isto vem ocorrendo sem uniformidade e bases adequadas.

A maioria dos laboratórios brasileiros não utiliza o C. septicum nas provas de desafio.

A substituição de cobaias por camundongos nas provas de proteção, como sugerem PERSONEUS et alii (1957) parece ser mais econômica e estatisticamente mais segura por permitir trabalhar com lotes maiores.

Nos EE.UU. PERSONEUS et alii (1957) observaram o comportamento irregular de vacinas comerciais anti-Carbúnculo Sintomático, frente a provas em animais de laboratório.

1.3. Objetivos

1.3.1. Avaliação de imunógenos anti-Carbúnculo Sintomático, mono e polivalentes, em uso no Brasil, quanto a:

- Esterilidade das bacterinas,
- Inocuidade,
- Proteção.

1.3.2. Substituição de cobaias por camundongos nas provas de proteção.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1. Imunógenos

GODOY (1910) no Brasil, produziu potentes vacinas com esporos vivos de amostra virulenta de C. Chauvoei, obtida por vegetação prolongada em caldo-soro glicosado.

MASON & SCHEUBER (1936) produziram bacterinas formuladas usando meios diferentes. Observaram que também uma densa suspensão de C. chauvoei fervida e injetada subcutaneamente, em carneiros, produzia alta proteção frente ao desafio intramuscular.

BRAGA (1942), testando bacterinas produzidas em substratos diferentes, concluiu que estes não interferem com a produção de imunidade.

BRAGA (1943) assim ordena o aparecimento das vacinas anti-Carbúnculo Sintomático:

a - A primeira vacina deve-se a Arloing, Cornevin & Tomas, em 1889. Mesmo sendo totalmente empírica foi de grande auxílio no controle da enfermidade naquela época.

b - Agressinas naturais (líquido de edemas), já abandonadas, Bail, em 1880.

c - Culturas vivas atenuadas devem-se a Kitazato, em 1889; Gomes, em 1908; Godoy, em 1910.

d - Filtrados de culturas devem-se a Roux & Chamberland, em 1887; Nita, em 1918; Eschorn, em 1918; Gramb & Scheuber, em 1920.

e - Culturas totais formoladas devem-se a Leclainche & Valée, em 1925; Mc Ewen, em 1926; Mason & Scheuber, em 1932.

RODRIGUES (1945) aperfeiçoou a técnica de produção de bacterinas formoladas (anacultura).

Para ROBERTS (1959) atualmente são três os tipos de vacinas anti-Carbúnculo Sintomático, em uso:

a - Diluição de culturas produzidas em sacos de celofane, conforme Sterne, Thorold & Scheuber, em 1951.

b - Cultura total morta pelo formol e com um a dois por cento de hidróxido de alumínio ou de potássio, Buddle, em 1954.

c - Toxóide precipitado pelo alúmen de potássio.

PERSONEUS et alii (1957), testando sete bacterinas de amostras de C. chauvoei de origens diferentes, an-

te duas amostras conhecidas de desafio, concluíram que a variação de nível de proteção foi decorrente mais do poder patogênico do que da capacidade antigênica de cada amostra.

Segundo SMITH & HOLDEMAN (1968), sendo os clostrídios muito disseminados na natureza, as oportunidades de reinfecções pós-vacinais garantem a imunidade para o resto da vida do animal, mesmo com vacinação única.

BROWN et alii (1976) verificaram que bacterina mista, não diluída, foi capaz de proteger 100% de bovinos e ovinos contra o C. chauvoei, C. septicum, C. sordelli e C. novyi. Diluída a 1:15 produziu idêntica proteção contra os três primeiros e apenas 50% anti-C. novyi.

O QUADRO I mostra uma relação das vacinas produzidas no Brasil, conforme dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, com modificações e acréscimos obtidos de bulas e contatos pessoais.

QUADRO I - Imunógenos Anti-Carbúnculo Sintomático Produzidos no Brasil.

Laboratórios	Composição Específica	Adjuvantes(l)	Doses
1. MONOVALENTES			
a. Inst. Biol. R. de J.	C.c	-	1 ml
b. Lab. de Biol. Veterinária	C.c	-	1 ml
c. Prod. Vet. Mangueiros	C.c	-	1 ml
d. Usinas Quím. Brasileiras	C.c	-	1 ml
2. BIVALENTES			
a. Farmopecuária S/A	C.c e C.s	-	2 ml
b. Inst. Biol. de S. P.	C.c e C.s (5:1)	não contém	2 ml
c. Inst. B. P. T. do Paraná	C.c e C.s	-	2 ml
d. Inst. Vallée S/A	C.c e C.s	-	1 ml
e. Inst. V. Rhodia M. S/A	C.c e C.s	-	1 ml
f. Inst. Vital Brasil S/A	C.c e C.s	-	1 ml

QUADRO I - Continuação

2.	3.	4.	5.	6.
LABORATÓRIOS	COMPOSIÇÃO ESPECÍFICA	ADJUVANTES(1)	DOSES	
2. BIVALENTES				
g. Lab. França	C.c e C.s	-	2 ml	
h. Lab. Geyer S/A	C.c e C.s	-	2 ml	
i. Lab. Hertape	C.c e C.s (4:1)	contém	2 ml	
j. Lab. Noli S/A	C.c e C.s	-	2 ml	
k. Lab. Procampo Ltda.	C.c e C.s	-	1 ml	
l. Pfizer Quím. Ltda.	C.c e C.s (4:1)	contém	2 ml	
3. QUADRIVALENTES				
a. Inst. Vallée S/A	C.c, C.s, C.p e C.n	-	3 ml	
b. Inst. V. Rhodia M. S/A	C.c, C.s, C.p e C.n	-	3 ml	
c. Lab. Pama	C.c, C.s, C.p e C.n	contém	3 ml	
d. Leivas Leite S/A I. Q. P.	C.c, C.s, C.p e C.n	contém	5 ml	

CÓDIGO: C.c = C. chauvoei

C.s = C. septicum

C.p = C. perfringens

C.n = C. novyi

(1) Muitos produtores de vacinas não deram informações sobre este tópico.

Duas vacinas contêm $AlK(SO_4)_2$; Duas contêm saponina.

2.2. Provas de Avaliação

Diversos trabalhos têm sido conduzidos neste sentido.

BRAGA (1943) assim define as condições aceitáveis para uma boa vacina:

- a - Prova de Esterilidade: manter-se estéril em aerobiose e anaerobiose.
- b - Prova de Pureza: crescimento do germe específico em anaerobiose e nenhum crescimento em outras condições.
- c - Prova de Antigenicidade: imunizando cobaios e desafiando-os com uma, duas e três doses letais (DL). Considera regular a vacina que protege contra duas DL e ótima a que protege contra três DL.

RODRIGUES (1945), no Instituto Biológico de São Paulo, em criterioso trabalho, estabeleceu as bases para um método de avaliação, que consiste em vacinar lotes de 20 cobaios e desafiá-los 30 dias após com 10 DL80. Comparou vacinas e bacterinas, e bacterinas e filtrados entre si, usando de imunização ativa de cobaios e desafio posterior. Encontrou níveis semelhantes de proteção. Método ligeiramente alterado, como por exemplo a exigência do mínimo de 25 cobaios, continua em uso naquele instituto (VIANNA - 1974).

THOROLD (1953), produzindo vacina por cultura em

saco de celofane, fez provas em carneiros e experimentou a soro-aglutinação; achou ser esta de valor limitado.

PERSONEUS et alii (1957) fizeram várias provas com bacterinas comerciais. Evitando empregar cobaios de maior custo, experimentaram camundongos com resultados satisfatórios. Observaram o comportamento irregular das bacterinas comerciais e recomendaram a padronização dos métodos de produção e controle, nos EE.UU.

SIEIRO & ASTARLOA (1964) usaram para desafio tecido lesado pela infecção, conservado a -20° C, triturado e diluído em cloreto de cálcio. Utilizaram cobaios, e a bacterina mais potente foi a formolada e precipitada pelo alúmen.

CHOMAN et alii (1968) avaliaram bacterinas monovalentes de C. septicum e mistas deste com Pasteurella sp, através de vacinação de cobaios e desafio com cultura esporulada livre de toxinas. Ambas bacterinas foram consideradas satisfatórias.

MÁRIO (1969) usou cobaios e carneiros testando vários tipos de bacterinas obtidas de culturas feitas em membrana de diálise. As adsorvidas pelo hidróxido de alumínio tiveram melhor comportamento, e as precipitadas pelo alúmen de potássio mostraram-se inconstantes.

A utilização de cobaios para avaliação de bacterinas é indicada pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970), com a exigência de 100% de proteção.

CLAUS & MACHEAK (1972) utilizaram cobaios como

animais de escolha para aferir grau de proteção de vacinas experimentais e comerciais.

MACHEAK et alii (1972 a) experimentaram a técnica de vacinação e desafio de bovinos e, paralelamente, usaram a soro-aglutinação em placa. O título aglutinante correspondeu como indicador de imunidade. As bacterinas foram também testadas, satisfatoriamente, em cobaios.

MACHEAK et alii (1972 b) avaliaram a potência anti-C. novyi de bacterinas mistas (C. chauvoei e C. novyi), usando cultura de C. novyi como desafio. As respostas de cobaios e carneiros vacinados foram semelhantes.

COELHO (1974), em correspondência pessoal, pela Pfizer Química Ltda., informa da utilização de cobaios vacinados com duas doses de um ml, intervaladas de 15 dias, e desafiados 15 dias após a última vacinação. A proteção esperada é de 80%.

3. MATERIAL

3.1. Imunógenos Comerciais

Para efeito de avaliação, uma vacina e cinco bacterinas foram adquiridas no comércio, dentro do período de validade, possuindo a seguinte composição:

- Monovalente (C. chauvoei) uma
- Bivalentes (C. chauvoei e C. septicum).. três
- Tetraivalente (C. chauvoei, C. septicum,
C. novyi e C. perfringens) duas

3.2. Amostras Utilizadas

Para produção de inóculo destinado a desafio, e também para produção de bacterinas-padrão, as seguintes amostras foram obtidas:

- C. chauvoei-1 e C. septicum-4 (1)
- C. chauvoei e C. septicum (cedidas pelo Laboratório Fama (2))
- C. chauvoei-a43 e C. septicum-VS3 (3)

3.3. Animais de Experimentação

Cobaios de qualquer sexo, obtidos de criações mantidas por órgãos oficiais ou oficiosos, pesando entre 250 e 400 g, de aspecto saudável, separados em pequenos lotes em gaiolas de arame, foram destinados à reativação das amostras e prova de potência das bacterinas-padrão.

Camundongos "SWISS", linhagem "Randon-CF-CPA", de ambos os sexos, pesando entre 25 e 28 g, mantidos em gaiolas metálicas, usados para estabelecer as doses DL100 (dose letal 100%) e DP50 (dose proteção 50%), também foram usados para avaliação das bacterinas comerciais.

Bezerros, sem raça determinada, de qualquer sexo, com idades variando entre quatro e cinco meses, não vacinados contra o Carbúnculo Sintomático, de bom aspecto físico, foram destinados às provas de inocuidade das bacterinas comerciais.

-
- (1) Central Veterinary Laboratory - "Bacteriology Department - Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Central Veterinary Laboratory" - Weybridge, Surrey, England.
 - (2) Laboratório Fama Ltda. - Cx. P. 1547 - Belo Horizonte - Brasil
 - (3) Instituto Biológico de São Paulo - Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 - São Paulo - Brasil

3.4. Meios de Cultura

Nas várias fases deste trabalho foram usados os seguintes: "Chopped Meat", "Robertson's MPM" e Ágar Sangue a 5,0%, glicosado a 0,5%, preparados de acordo com as técnicas descritas por SMITH & HOLDEMAN (1968); Caldo Tio glicolatado (4) e "Phenol Red Agar Base" (4).

(4) Meios n.^{os} 0363/01 e 0098/02, DIFCO Laboratories - Detroit - Mich. - U.S.A. 48232

4. MÉTODOS

4.1. Amostras-Padrão

4.1.1. Reativação

Todas as amostras foram submetidas à reativação por passagem em cobaias, quando se observou que algumas se achavam muito adaptadas aos meios artificiais de cultivo e com baixo poder patogênico para os cobaios experimentalmente inoculados.

As inoculações, em volumes variáveis, foram feitas nos músculos flexores das pernas. O inóculo constituiu-se de culturas obtidas no "Robertson's MPM", ao qual se adicionou glicose a 1,0%, para favorecer a vegetação. As incubações foram a vácuo, por 24 h, a 37° C. Ao inóculo foi adicionado cloreto de cálcio a 5,0%, em igual volume, obtendo-se a concentração final de 2,5%. Os cobaios

4. MÉTODOS

4.1. Amostras-Padrão

4.1.1. Reativação

Todas as amostras foram submetidas à reativação por passagem em cobaias, quando se observou que algumas se achavam muito adaptadas aos meios artificiais de cultivo e com baixo poder patogênico para os cobaios experimentalmente inoculados.

As inoculações, em volumes variáveis, foram feitas nos músculos flexores das pernas. O inóculo constituiu-se de culturas obtidas no "Robertson's MPM", ao qual se adicionou glicose a 1,0%, para favorecer a vegetação. As incubações foram a vácuo, por 24 h, a 37° C. Ao inóculo foi adicionado cloreto de cálcio a 5,0%, em igual volume, obtendo-se a concentração final de 2,5%. Os cobaios

foram sacrificados no período agônico e o sangue colhido assepticamente, por punção cardíaca e semeado no "Robertson's MPM", após fervura e resfriamento.

4.1.2. Reisolamento

O reisolamento e a confirmação da pureza foram feitos em placas de Ágar Sangue. Para o reconhecimento do germe observaram-se os tipos de colônia, fermentações desenvolvidas no meio "Phenol Red Agar Base", ao qual se adicionou sacarose ou salicina. Também se fez bacterioscopia pelo método de Gram.

4.1.3. Escolha de Amostra para Desafios

As amostras de C. chauvoei-a43 e C. septicum-OMS mostraram-se mais agressivas e foram escolhidas para os trabalhos de desafio.

4.1.4. Culturas em Grande Volume

Foram obtidas em "Robertson's MPM" recentemente preparado, distribuídas em frascos de 450 ml. Usou-se inóculo de 10 ml e incubação, sob vácuo de 20 libras, por 12h, a 37° C. Foram, então, filtradas em camadas de gaze, distribuídas em frascos de 10 ml e imediatamente estocadas a -20° C.

4.1.5. Doses Letais

4.1.5.1. Determinação da DL para cobaias

Os trabalhos de reativação já haviam sugerido a DL para cobaias. Para confirmação foram inoculados cinco cobaias de 300,0 a 400,0 g, ficando estabelecido que a DL seria a que matasse cinco no período de dois dias. A via intramuscular foi usada com técnica idêntica à da reativação das amostras (item 4.1.1.).

4.1.5.2. Determinação da DL para camundongos

Para a cultura desafio de C. chauvoei utilizou-se de técnica idêntica à da "reativação", item 4.1.1., nos volumes de 0,1 a 0,4 ml.

Para a cultura de C. septicum, bem mais agressiva, tomou-se o cloreto de cálcio a 3,12% e à proporção de 1:5 para a mesma concentração final de 2,5%, evitando-se trabalhar com doses muito pequenas.

4.2. Bacterinas-Padrão

4.2.1. Preparação

Bacterinas-Padrão, anti-C. chauvoei (amostra a-43) e duas outras anti-C. septicum (amostras 4 e OMS) foram preparadas conforme a técnica usada para a bactéria C. chauvoei por RODRIGUES (1945), modificada principalmente quanto ao substrato e adição de alúmen de potássio, como adjuvante.

4.2.1.1. Cultivo

Cada amostra foi inoculada, separadamente, em 400 ml de meio "Chopped Meat", glicosado a 1,0%, usando-se inóculo de 10 ml e incubação a vácuo, de 20 libras a 37° C por 48 h.

4.2.1.2. Filtração

Foi feita em camadas de gaze, para retirada de partículas sólidas.

4.2.1.3. Inativação

Para o C. chauvoei foi adicionado formol (5) P. A. na concentração de 0,8%. Para o C. septicum, concentração final 0,5%. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C, por 48 h, e a seguir em temperatura ambiente por mais cinco dias.

4.2.1.4. Adição de adjuvante

O AlK (SO₄)₂ (6) foi usado numa solução a 10%, adicionado até concentração final de 1,0% a cada preparação. O pH foi acertado para seis com solução N/1 de Na(OH). As bacterinas em elaboração foram mantidas para precipitação por mais 48 h a 30° C (MÁRIO, 1969).

(5) Formaldeído Merck-70070545 - E. Merck A. G. Darmstaelt - Germany

(6) REAGEN-QUIMBRÁS Ind. Quím. Ltda. - Rio de Janeiro

4.2.1.5. Distribuição

Foi feita em frascos de 10 ml, devidamente rotulados.

4.2.2. Provas de Controle

4.2.2.1. Esterilidade

Foi comprovada pela semeadura em Caldo Tioglicolato e no "Chopped Meat", por incubação em aerobiose e anaerobiose, a 37° C com leitura em 48 h.

4.2.2.2. Inocuidade

Esta prova foi feita por observação dos próprios cobaios vacinados para os testes de proteção.

4.2.2.3. Proteção em cobaios

Em linhas gerais foram seguidas as diretrizes do "BRITISH VETERINARY CODEX" (1970), que assim podem ser resumidas: "vacinação de, pelo menos, 10 cobaios por via subcutânea, com a recomendada dose primária, e revacinação 21 a 25 dias após. Depois de 10 a 14 dias da segunda vacinação, desafiá-los juntamente com mais 5 testemunhas. Nenhum vacinado deve morrer dentro de 5 dias, enquanto os testemunhas morrem em 48 horas." Foi extrapolada para a bacterina de C. septicum esta mesma técnica de desafio, conforme sugestão de CHOMAN et alii (1968). Para cada

bacterina foi usado um lote de 10 cobaias, pesando em torno de 400 g por unidade. Cada cobaio foi vacinado com um ml e revacinado com a mesma dose, 14 dias após. Decorridos 14 dias da segunda vacinação, os cobaias mais cinco testemunhas, não vacinados, para cada lote, foram desafiados com uma DL adicionada de cloreto de cálcio.

4.2.2.4. Proteção 50% em camundongos

a) Bacterina anti-C. chauvoei

A DP50 foi procurada conforme a técnica de PERSONEUS et alii (1957), partindo-se de diluições seriadas da Bacterina-Padrão, em solução fisiológica. Foram usados lotes de 10 camundongos por diluição, vacinados via intraperitoneal, uma só vez, na dose de 0,5 ml. Em lugar de camundongos pesando entre 17 a 20 g, recomendados pela técnica original, preferiu-se entre 25 e 28 g que não apresentaram inconvenientes e facilitaram as inoculações intramusculares por ocasião dos desafios. Substituiu-se, também, o fator de três de diluição, pela técnica de duplicar o volume do diluente frente a um volume constante da bacterina (fator dois de adição de diluente). Após duas semanas, foram desafiados com uma DL100 e observados por 72 h. Para cálculos estatísticos seguiu-se a técnica de REED & MUENCH (1938).

b) Bacterina anti-C. septicum

As provas de avaliação da DP50, repetidas três vezes, foram feitas com a técnica citada no item anterior, modificada unicamente com relação às diluições.

4.3. Imunógenos Comerciais

4.3.1. Identificação

A vacina e as cinco bacterinas comerciais destinadas à avaliação, principalmente, das qualidades imunogênicas, descritas no item 3.1., foram identificadas como se segue:

AM - monovalente (<u>C. c.</u>), dose indicada..	1 ml
BH - bivalente (<u>C. c.</u> e <u>C. s.</u>), dose indicada	2 ml
CR - bivalente (<u>C. c.</u> e <u>C. s.</u>), dose indicada	1 ml
DI - bivalente (<u>C. c.</u> e <u>C. s.</u>), dose indicada	2 ml
EF - quadrivalente (<u>C. c.</u> , <u>C. s.</u> , <u>C. n.</u> e <u>C. p.</u>) dose indicada	3 ml
FV - quadrivalente (<u>C. c.</u> , <u>C. s.</u> , <u>C. n.</u> e <u>C. p.</u>) dose indicada	3 ml

4.3.2. Provas de Controle

4.3.2.1. Esterilidade

As cinco bacterinas (BH, CR, DI, EF e FV) foram testadas por inoculação de 1 ml em Caldo Tioglicolatado e "Robertson's MPM" em aerobiose e anaerobiose, incubadas a 37° C por 48 h.

4.3.2.2. Inocuidade

Esta prova foi feita vacinando-se dois bezerros, de três a cinco meses para cada produto. A dose foi a indicada pelos fabricantes, por via subcutânea.

4.3.2.3. Proteção 50% em camundongos

a) Proteção anti-C. chauvoei

Para esta prova, executada em comparação com Bacterina-Padrão, a dose indicada pelo fabricante foi diluída em solução fisiológica, mantendo-se a proporção encontrada como DP50 para a Bacterina-Padrão.

b) Proteção anti-C. septicum

Como não se obteve uma bacterina do C. septicum satisfatória, que servisse como referência, não foi possível, também, a DP50. Procurou-se, neste caso, testar a presença de qualquer nível de proteção frente ao desafio C. septicum não diluído.

4.3.2.4. Substituição de cobaias por camundongos
nas provas de proteção

A viabilidade será comprovada utilizando-se das
Bacterinas-Padrão como ponto de referência.



5. RESULTADOS

5.1. Provas de Controle

5.1.1. Esterilidade

As bacterinas comerciais e as Padrão, todas formuladas, mostraram-se estéreis em aerobiose e anaerobiose.

5.1.2. Inocuidade

Todos os imunógenos mostraram-se inócuos, apesar de uma pequena reação dolorosa e ligeiro edema local, passageiro e variável em sua intensidade.

5.1.3. Proteção

5.1.3.1. Determinação da DL para cobaias

Para o C. chauvoei a DL foi de 0,3 ml e para o C. septicum de 0,05 ml.

5.1.3.2. Avaliação das Bacterinas-Padrão em co-
baños

O QUADRO II apresenta o resultado do teste feito
com as Bacterinas-Padrão C. chauvoei e C. septicum.

QUADRO II - Provas de Proteção das Bacterinas-Padrão de C. chauvoei e C. septicum, em
Cobaíes.

Bacterinas	Doses		Número de Animais			
	Bacterinas	Desafios	Vacinas dos	Testes	Mortos	Sobreviventes
			dos	das	das	das
			vacinas	vacinas	vacinas	vacinas
			testadas	testadas	testadas	testadas
			animais	animais	animais	animais
<u>C. chauvoei</u>	1 ml	0,3 ml	10	5	0	10
<u>C. septicum</u>	1 ml	0,05ml	10	5	5	5

5.1.3.3. Avaliação das Bacterina-Padrão em camundongos

a) Determinação da DL100 das amostras-desafio

No QUADRO III são apresentados os resultados do C. chauvoei, e, no QUADRO IV, os do C. septicum.

QUADRO III - Determinação da DL100, para Camundongos da Amostra-Desafio C. chauvoei.

N.º de Ordem das Gaiolas	Doses(+) Inoculadas	Número de Animais		
		Inoculados	Mortos	Sobreviventes
1	0,4 ml(++)	10	10	0
2	0,3 ml	10	7	3
3	0,2 ml	10	0	10
4	0,1 ml	10	0	10

(+) Contendo 50% da solução de cloreto de cálcio a 5%.

(++) DL100 = 0,2 ml de cultura pura.

QUADRO IV - Determinação da DL100, para Camundongos, da Amostra-Desafio C. septicum.

N.º de Ordem das Gaiolas	Doses(+) Inoculadas	Número de Animais		
		Inocula dos	Mortos	Sobrevi- ventes
1	0,4 ml	10	10	0
2	0,3 ml	10	10	0
3	0,2 ml	10	10	0
4	0,1 ml(++)	10	10	0
5	0,05ml	10	5	5

(+) Contendo 80% da solução de cloreto de cálcio a 3,12%.

(++) DL100 = 0,02 ml de cultura pura.

b) Determinação da DP50 das Bacterinas-Padrão

O QUADRO V mostra a determinação da DP50, da bacterina C. chauvoei, e o QUADRO VI a última tentativa feita com a bacterina C. septicum.

QUADRO V - Determinação da DP50 da Bacterina-Padrão C. chauvoei, em Camundongos.

Bacterina-Padrão		Número de Animais			Resultados Acumulados		
<u>C. chauvoei</u>	Doses	Inoculados	Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes	% Mortalidade
1:3	0,5 ml	10	2	8	2	17	11
1:5	0,5 ml	10	3	7	5	9	36
1:9	0,5 ml	10	8	2	13	2	87
1:17	0,5 ml	10	10	0	23	0	100

A DP50 correspondeu a 1:5,8, também representada no GRÁFICO I.

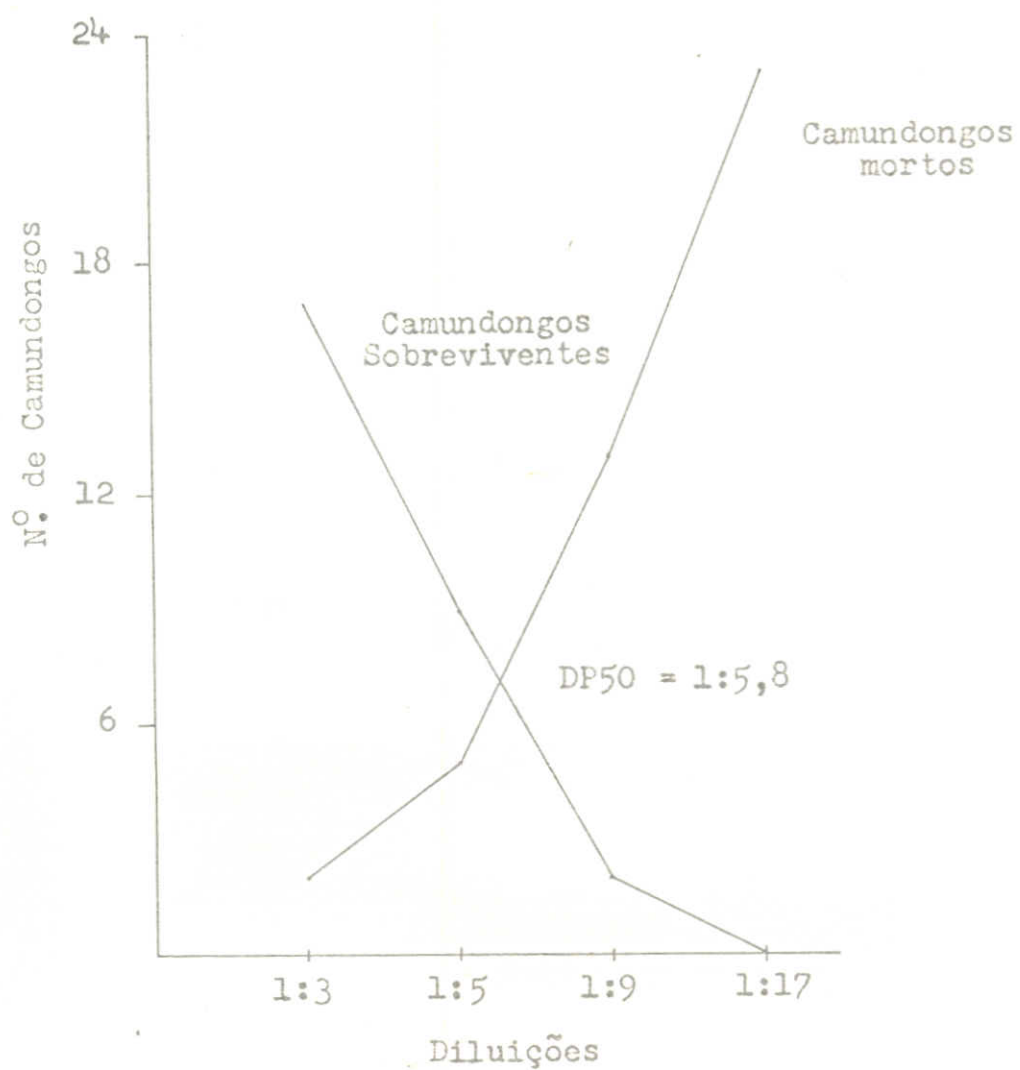


GRÁFICO I - Estimativa da DP50 da Bacterina-Padrão C.
chauvoei, em Camundongos.

QUADRO VI - Tentativa de Determinação da DP50 da Bacterina-Padrão C. septicum, em Camundongos.

Bacterina-Padrão		Número de Animais		
<u>C. septicum</u>				
Diluições	Doses	Inoculados	Mortos	Sobreviventes
1:1,5	0,5 ml	10	9	1
1:2	0,5 ml	10	9	1
1:3	0,5 ml	10	10	0
1:5	0,5 ml	10	10	0

Por falta de proteção não foi possível a obtenção da DP50.

5.1.3.4. Avaliação da proteção anti-C. chauvoei dos imunógenos comerciais

O QUADRO VII mostra o comportamento de cada imunógeno comercial, diluído conforme a DP50 estabelecida para a Bacterina-Padrão, frente ao desafio C. chauvoei, em camundongos.

QUADRO VII - Avaliação em Camundongo dos Imunógenos Comerciais, com Base na DP50 da Bacterina-Padrão, Frente ao C. chauvoei.

Imunógenos Comerciais		Diluição		Números de Animais		
Identificação	Doses Indicadas para Bovinos	Padronizada(+)	Vacina dos	Mortos	Sobreviventes	% Proteção
AM	1,0 ml	1:5,8 ml	10	2	8	80
BH	2,0 ml	2:5,8 ml	10	8	2	20
CR	1,0 ml	1:5,8 ml	10	5	5	50
DI	2,0 ml	2:5,8 ml	10	5	5	50
EF	3,0 ml	3:5,8 ml	10	9	1	10
FV	3,0 ml	3:5,8 ml	10	7	3	30

(+) Inóculo = 0,5 ml

5.1.3.5. Avaliação da proteção anti-C. septicum
dos imunógenos comerciais

O QUADRO VIII contém a comparação dos imunógenos mistos comerciais, e o Padrão anti-C. septicum não diluídos, na dose de 0,5 ml, em camundongos, frente ao desafio C. septicum.

QUADRO VIII - Prova de Proteção, em Camundongos dos Imunógenos Comerciais e Padrão, Contendo o C. septicum.

Imunógenos	Número de Animais			
	Vacina- dos	Mortos	Sobrevi- ventes	% Sobrevi- ventes
Padrão	10	8	2	20
BH	10	10	0	0
CR	10	10	0	0
DI	10	10	0	0
EF	10	10	0	0
FV	10	10	0	0

5.2. Substituição de Cobaios por Camundongos nas Provas de Proteção

Os resultados obtidos com as provas de proteção das Bacterinas-Padrão em cobaios (QUADRO II), e DP50 em camundongos (QUADRO V) são, em verdade, dados comparativos. No capítulo próprio será discutida a viabilidade da substituição.

6. DISCUSSÃO

6.1. Padrão de Referência

No Brasil não há um padrão para aferição da capacidade de proteção das bacterinas anti-Carbúnculo Sintomático. O único trabalho brasileiro encontrado sobre o assunto no levantamento efetuado foi o de RODRIGUES (1945), o qual vem funcionando como modelo, algumas vezes com variações. Ainda hoje, no Instituto Biológico de São Paulo, onde foi desenvolvida a técnica, usa-se o mínimo de 25 cobaios para imunização e, quatro semanas após, estes são desafiados com 10 DL80. Exige-se a sobrevivência de pelo menos 50% dos cobaios.

O Laboratório Pfizer, também em São Paulo, protege os cobaios com duas doses intervaladas de 15 dias. Passadas duas semanas da última inoculação, desafia com "cul

tura virulenta". Oitenta por cento dos cobaios, pelo menos, devem sobreviver.

Talvez o maior problema em se avaliar as propriedades imunológicas de qualquer tipo de bacterina seja o método de desafio. As bacterinas anti-Carbúnculo Sintomático vêm sendo testadas frente a unidades de desafio não padronizadas. Na literatura compulsada há variações de designação e de capacidade letal, tais como: DSL (dose seguramente letal), BRAGA (1943); DL 80, RODRIGUES (1945) e CHOMAN et alii (1968); DL50, SIEIRO & ASTARLOA (1964); DLM (70 a 100%), MÁRIO (1969); DL100, BRITISH VETERINARY CODEX (1970) e BROWN et alii (1976). Esse problema desafio foi bem comentado por PERSONEUS et alii (1957) ao dizerem da possibilidade de ampla margem de erro existente na avaliação de vacinas em decorrência do desafio não padronizado. Assim a mesma bacterina avaliada com duas amostras-desafio diferentes, provavelmente terá comportamento também diferente, considerando a diversidade do poder invasor ou agressividade da amostra. Sugerem a criação de uma Bacterina-Padrão que seria o elemento comparativo.

Não tendo sido possível obter-se Bacterinas-Padrão, duas partidas foram elaboradas, tentando criar Bacterinas de Referência para comparação, separadamente, da proteção anti-C. chauvoei e anti-C. septicum.

A cultura destinada a desafio foi obtida em "Robertson's MPM" pouco propício à formação de toxinas, dando assim oportunidade ao desenvolvimento de infecção nas provas experimentais, ao invés de indesejável e fatal toxemia.

Não houve preocupação com relação à seleção de amostras destinadas à produção de bacterinas, pois seguiu-se a orientação de PERSONEUS et alii (1957) que demonstraram ser a variação do nível de proteção uma decorrência mais do poder patogênico do desafio, do que poder antigênico das amostras utilizadas. Usaram dois diferentes desafios heterólogos para sete bacterinas testadas e preparadas com amostras diferentes entre si. Em uma fase posterior do mesmo trabalho, usando um desafio homólogo, não houve interferência com os resultados.

Dada a dificuldade de se liofilizar esporos lavados, as culturas foram mantidas a -20° C, aparentemente sem prejuízo do poder patogênico, até após sete meses.

A determinação do poder letal para cobaias foi feita com base no "BRITISH VETERINARY CODEX" (1970) que exige 100% de mortalidade (5/5) com relação ao C. chauvoei. No presente trabalho, técnica idêntica foi aplicada ao C. septicum, aparentemente com bons resultados. Esta extrapolação foi sugerida por CHOMAN et alii (1968) em trabalho sobre a avaliação da potência imunogênica de ana culturas.



6.1.1. Preparo das Bacterinas

Em ROBERTS (1959) tem-se uma relação dos três tipos de vacina anti-Carbúnculo Sintomático considerados como sendo os atualmente em uso. Não mencionou a vacina de esporos vivos, apenas atenuados, de C. chauvoei. Esta, muito usada no Brasil, tem como maior limitação, não poder ser associada ao C. septicum ou outros patógenos, devido à adição de inativantes.

Na produção das Bacterinas-Padrão, predominaram os dados técnicos contidos em RODRIGUES (1945). A adição do alúmen de potássio deve-se ao fato de ser este o adjuvante de uso mais difundido. De modo geral, a mesma técnica usada para a bacterina C. chauvoei foi extrapolada para a do C. septicum.

Ao contrário do observado por BRAGA (1942) com relação à não interferência de substratos na produção de imunidade anti-Carbúnculo Sintomático, SMITH & HOLDEMAN (1968) citam a adição de extrato de levedura aos meios de cultura como capaz de favorecer a formação de toxinas. Por isso, preferiu-se para a produção das Bacterinas- Padrão, o meio "Chopped Meat" que contém 0,5% deste extrato, uma vez que sendo as toxinas ótimos antígenos, deve ser esperada uma direta interferência na produção de imunidade. A adição de 0,8% de formol para a bacterina C. chauvoei foi feita de acordo com RODRIGUES (1945). Para a bacterina C. septicum, adicionou-se 0,5%, conforme o usado pelo Insti-

tuto Biológico de São Paulo, embora não tenha sido encontrada uma explicação para o uso daquelas concentrações diferentes, principalmente por ser o C. septicum mais toxígeno e receber menor quantidade de inativante.

6.1.2. Provas de Controle

As provas de esterilidade foram concluídas após incubação de 48 h em "Chopped Meat" e Caldo Tioglicolato. RODRIGUES (1945) observou presença, em alguns casos, de esporos vivos em bacterinas tratadas pelo formol. SMITH & HOLDEMAN (1968) informaram que, às vezes, só se consegue crescimento bacteriano usando-se grande inóculo, e que isto se deve a carências nutritivas do meio, que são corrigidas por ingredientes fornecidos pelo próprio inóculo. Nestas provas, mesmo usando-se inóculo de um ml, a eventual presença de germes vivos, em muito pequena quantidade por ter sido tratados pelo formol, poderia também não ter sido detectada naquele prazo.

Nas provas de inocuidade não houve acidente vacinatório. Era esperada pequena reação dolorosa e/ou ligeiro edema passageiro, por tratar-se de bacterinas formoladas, não purificadas, e, principalmente, por conterem como adjuvante o alúmen de potássio. Assim, as bacterinas testadas foram consideradas satisfatórias também a estas provas.

Para provas de proteção de vacinas, o ideal se-

ria testá-las no próprio animal a que se destinam. Assim, THOROLD (1953) utilizou somente carneiros, enquanto MÁRIO (1969) e MACHEAK et alii (1972-b) empregaram carneiros e, paralelamente, cobaios com resultados satisfatórios.

Bezerros foram utilizados, também paralelamente a cobaios, como animais de prova nos testes de proteção de bacterinas anti-Carbúnculo Sintomático, por MACHEAK et alii (1972-a) e BROWN et alii (1976) com resultados semelhantes. Estes resultados autorizam a substituição de bezerros por cobaios em trabalhos de rotina. Considerando principalmente as dificuldades de se obterem bezerros ou carneiros isentos de anticorpos contra os Clostridia, cobaios têm sido mais empregados em testes de eficiência. Foram preferidos por RODRIGUES (1945), SIEIREO & ASTARLOA (1964), CHOMAN et alii (1968), BRITISH VETERINARY CODEX (1970), CLAUS & MACHEAK (1972), COELHO (1974) e VIANNA (1974).

Visando, principalmente, os custos das provas de avaliação, PERSONEUS et alii (1957) substituíram cobaios por camundongos com resultados considerados mais precisos, e, portanto, tecnicamente mais indicados. O emprego de maior número de animais influencia diretamente na DP50, unidade usada no presente trabalho e no de PERSONEUS et alii (1957) e de BROWN et alii (1976). Outras vantagens da substituição de cobaios por camundongos estão discutidas no item 6.3.

Com relação à proteção desenvolvida em cobaias inoculados com as Bacterinas-Padrão C. chauvoei e C. septicum, observou-se total eficiência da primeira, enquanto a segunda só protegeu 50% dos animais (QUADRO II). A deficiência apresentada pela bacterina C. septicum não era esperada.

Uma segunda partida, elaborada com a amostra C. septicum-OMS, de crescimento luxuriante, usada também no desafio — técnica anteriormente seguida para produção de bacterina contra o C. chauvoei — também foi insatisfatória, conforme resultados registrados no QUADRO VI, onde não foi possível estabelecer a DP50, mesmo utilizando-se de diluições menores. Tal resultado está de acordo com afirmações já discutidas, de PERSONEUS et alii (1957). Os resultados insatisfatórios devem estar ligados à própria técnica de elaboração da bacterina e não ao método de desafio, pois foi utilizada a técnica desafio-infecção, sugerida por CHOMAN et alii (1968), ao invés de desafio-toxemia.

A determinação da DP50 da Bacterina-Padrão C. chauvoei preconizada por PERSONEUS et alii (1957) foi efetuada em termos de unidade 50%, de acordo com REED & MULENCH (1938), unidade esta sem dúvida estatisticamente menos afetada pelas chances de variações do que em outras faixas, como a de 100%. O QUADRO V e o GRÁFICO I mostram que o ponto final DP50 foi igual a 1:5,8.

6.2. Bacterinas Comerciais

A elaboração de bacterinas, em vez de vacina, como Imunógenos de Referência, prendeu-se ao fato da acentuada predominância de bacterinas registradas no Ministério da Agricultura e também por não haver ainda vacina anti-C. septicum (germe vivo) em uso. Com relação à composição, 12 delas são bivalentes, contendo C. chauvoei e C. septicum (QUADRO I).

Os seis imunógenos comerciais, por questão de ética, receberam uma identificação particular, conforme item 4.3.1.

Observou-se carência de informações técnicas na maioria das bulas dos produtos, impossibilitando a obtenção de dados sobre a presença de inativantes e adjuvantes, sobre suas concentrações, bem como sobre as proporções de antígenos nas bacterinas mistas, importantes nos trabalhos de avaliação.

O QUADRO I mostra o agrupamento das vacinas segundo sua composição. Com relação a adjuvantes não foi possível obter informações complementares de todos laboratórios, embora reiteradamente solicitadas. Nota-se, ainda neste quadro, diversidade do volume das doses — um a cinco ml — o que constitui uma evidência da falta de padronização, falta esta também existente com relação a adjuvantes, composição específica e meios para produção.

Dos vinte imunógenos produzidos no Brasil, trabalhou-se com os seis cuja obtenção foi possível. Este foi o único critério de seleção, apesar de sabidamente inadequado.

6.2.1. Provas de Controle

6.2.1.1. Esterilidade

As bacterinas comerciais, todas inativadas pelo formol, como era de se esperar mostraram-se estéreis. Ao lado desta vantagem, a adição de formol pode causar desnaturação das proteínas após alguns meses de continuada ação. Este tópico não foi estudado dada a falta de informação e, principalmente, da exigüidade do tempo. O período de validade de vacina deste tipo foi estudado por RODRIGUES (1945) e fixado em 12 meses. Por isso mesmo as Bacterinas-Padrão inativadas com as quantidades de formol, prescritas por este autor e testadas semanas após, podem ser consideradas em plena validade.

6.2.1.2. Inocuidade

Quanto à inocuidade, os resultados foram satisfatórios, não obstante as reações locais, passageiras, atribuídas, principalmente, à adição de diferentes adjuvantes em alguns dos produtos testados.

6.2.1.3. Proteção

A avaliação da proteção anti-C. chauvoei dos imunógenos comerciais, em comparação com a DP50 da Bacterina--Padrão, mostrada no QUADRO VII, indica um comportamento, com amplitude de variação da proteção relativa (DP50), entre 10 e 80%. Tais variações devem estar ligadas mais às técnicas de elaboração — escolha de amostras, densidade bacteriana obtida e adição de adjuvantes — do que ao método comparativo utilizado. Sem dúvida, os imunógenos atenuados, porém vivos, representados neste trabalho por uma vacina esporulada, devem estimular uma formação de imunidade mais intensa. O resultado de 80% de proteção observado deve-se a produto deste tipo.

Nas condições deste experimento, duas bacterinas contendo saponina deram resultados inferiores, levando-se à suposição que saponina não é elemento essencial para favorecer a produção de imunidade. Quanto às duas bacterinas que deram resultados exatamente iguais à Padrão, uma não continha adjuvante, e sobre a outra, não há informação. Deste modo, não é possível opinar, com segurança, sobre a importância da adição de adjuvantes.

No QUADRO VIII, vê-se uma completa ausência de proteção contra o C. septicum, pelo menos pela técnica de vacinação única. Como afirmaram SMITH & HOLDEMAN (1968), nos animais a campo, as possíveis infecções pós-vacinais interferem como reforço, garantindo a manutenção da imuni

dade por toda a vida do animal. Esta possibilidade poderia não existir para proteção anti-C. septicum, se o esperado estímulo vacinatorio inicial não fosse alcançado.

Animais mortos pelo C. septicum podem, pelo menos em alguns casos, receber falso diagnóstico clínico de "Manqueira" e serem responsáveis pelo aumento dos casos de mortes de animais vacinados. Esta possibilidade poderia ocorrer tanto em função da deficiência em propriedades imunogênicas anti-C. septicum das bacterinas, como por ausência do C. septicum, quando se trata de vacinas monovalentes do C. chauvoei.

A comparação de Bacterina-Padrão e comerciais anti-C. chauvoei, baseada na DP50 para camundongos, foi feita através do percentual de concordância, cujos resultados se encontram no QUADRO IX. Observa-se que o produto identificado como AM, superou bastante a Bacterina-Padrão, o que deve estar ligado ao fato de se tratar de vacina em seu senso restrito, isto é, imunógeno de esporo vivo, tão somente atenuado.

As duas bacterinas comerciais que nos QUADROS VIII e IX equalizaram-se à Padrão, poderiam ter apresentado estes bons resultados como decorrência da utilização de amostra mais antigênica em sua elaboração. A amostra empregada na produção de uma delas é a mesma usada na Bacterina-Padrão, não havendo informação quanto à outra. Assim, a falta de dados completos impede discutir melhor o assunto. Pode-se afirmar, entretanto, que as vacinas co-

QUADRO IX - Comparação de Imunógenos-Padrão C. chauvoei e Comerciais Baseada na DP50 para Camundongos, e seu Potencial de Concordância.

Imunógenos	Proteção Relativa (DP50)	Percentual de Concordância
Padrão	50	100
AM	80	160
BH	20	40
CR	50	100
DI	50	100
EF	10	20
FV	30	60

merciais anti-Carbúnculo Sintomático em uso no Brasil, vêm, em geral, sendo produzidas sem o necessário controle de eficiência.

Sendo o C. chauvoei pouco toxígeno "in vitro" e relativamente exigente nos cultivos, não é fácil a obtenção de culturas densas como se obtêm com o C. septicum. É possível seja este um fator de grande interferência no comportamento irregular nas provas de potência feitas com as bacterinas comerciais do C. chauvoei.

Assim, parece lógico concluir-se que a associação de antígenos nas bacterinas mistas, em lugar de tra-

zer o benefício esperado, pode estar sendo apenas um fator de diluição, dado o volume da cultura adicionada, reduzindo assim a proteção anti-C. chauvoei.

Quanto às deficiências observadas nas bacterinas C. septicum, parece mais lógico atribuí-las a um possível não atendimento de exigências técnicas específicas, como incubação por tempo mais longo, objetivando aproveitamento de maior quantidade de toxinas ou escolha de amostra mais antigênica.

6.3. Substituição de Cobaios por Camundongos nas Provas de Proteção

PERSONEUS et alii (1957) apresentaram forte sugestão no sentido de se substituírem cobaios por camundongos como indicadores da proteção das bacterinas anti-Clostridia. Deste modo, procurou-se estabelecer, também para camundongos, a DL100 cujos resultados se encontram nos QUADROS III e IV.

Foram utilizados lotes homogêneos de animais, porém bem mais pesados (25 a 27 g, ao invés de 17 a 20 g), sem nenhuma aparente desvantagem e facilitando, grandemente, os trabalhos de inoculação. Observados por 48 h, 80% morreram na metade deste tempo, embora tenham sido inoculados somente com 1 DL100. Isto é uma vantagem em relação à utilização de cobaios, cuja observação pode se estender por período de até sete dias. Outras vantagens li

gadas à ordem econômica são: menor custo, menor espaço vital em biotérios ou infectórios, consumo reduzido de rações e maior facilidade de manejo.

Tudo isto possibilita utilização de lotes maiores e, conseqüentemente, maior segurança estatística.

7. CONCLUSÕES

Com base nos dados avaliados sob as condições em que foi feito este trabalho, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

7.1. O comportamento irregular dos imunógenos comerciais em uso no Brasil decorre, principalmente, da falta de padronização dos métodos de produção.

7.2. O estabelecimento de métodos padronizados de produção exige pesquisas sobre os seguintes tópicos:

- a- interferências das amostras utilizadas na produção, principalmente quanto a antigenicidade;
- b- interferência do substrato e tempo de incubação, principalmente na produção de toxina para fabricação de bacterina de C. septicum;

- c- valor real dos adjuvantes utilizados, concentrações adequadas e introdução, se indicada, de novos produtos;
- d- concentração bacteriana mínima, inclusive a indicação de técnica exequível de verificação.

7.3. Antes de se produzirem bacterinas associadas de C. chauvoei a C. septicum, C. novyi e C. perfringens, é necessário:

- a- determinar a melhor técnica de produção de cada uma;
- b- submetê-las a provas separadas, principalmente quanto à proteção;
- c- determinar as proporções para uma associação satisfatória.

7.4. Camundongos podem substituir cobaios nas provas de proteção anti-C. chauvoei e C. septicum, com algumas vantagens, principalmente econômicas.



8. SUMÁRIO

O presente trabalho contém a avaliação de seis imunógenos comerciais produzidos no Brasil: uma vacina monovalente (C. chauvoei); três bacterinas mistas (C. chauvoei e C. septicum) e duas bacterinas polivalentes (C. chauvoei, C. septicum, C. novyi e C. perfringens).

Os imunógenos comerciais foram avaliados quanto a esterilidade (bacterinas), inocuidade e, principalmente, quanto a proteção frente a desafio-infecção pelo C. chauvoei e pelo C. septicum, em camundongos.

8.1. Esterilidade e Inocuidade

Todas as bacterinas comerciais foram consideradas estéreis e todos os imunógenos, inclusive a vacina, satisfatoriamente inócuos.



8. SUMÁRIO

O presente trabalho contém a avaliação de seis imunógenos comerciais produzidos no Brasil: uma vacina monovalente (C. chauvoei); três bacterinas mistas (C. chauvoei e C. septicum) e duas bacterinas polivalentes (C. chauvoei, C. septicum, C. novyi e C. perfringens).

Os imunógenos comerciais foram avaliados quanto a esterilidade (bacterinas), inocuidade e, principalmente, quanto a proteção frente a desafio-infecção pelo C. chauvoei e pelo C. septicum, em camundongos.

8.1. Esterilidade e Inocuidade

Todas as bacterinas comerciais foram consideradas estéreis e todos os imunógenos, inclusive a vacina, satisfatoriamente inócuos.

8.2. Avaliação da Proteção

A avaliação anti-C. chauvoei foi feita em camundongos por comparação da dose proteção a 50%, usando-se como termo de referência bacterina produzida pelo autor — Bacterina-Padrão. Usou-se uma única vacinação intraperitoneal e desafio duas semanas após com dose letal a 100% de cultura conservada a -20° C. A vacina de esporos vivos atenuados apresentou resultado superior ao da Padrão; duas bacterinas equipararam-se e três outras exibiram proteção inferior.

As tentativas de produzir Bacterina-Padrão de C. septicum não deram resultado satisfatório. Constatou-se não existir qualquer nível de proteção anti-C. septicum nas bacterinas comerciais contendo este germe.

8.3. Substituição de Cobaios por Camundongos

Esta substituição mostrou-se viável, sem qualquer restrição aparente e com vantagens principalmente quanto à economia.

9. SUMMARY

The present work contains the evaluation of six commercial immunizings produced in Brazil: one vaccine monovalent (C. chauvoei); three mixed bacterins (C. chauvoei and C. septicum); and two polyvalent bacterins (C. chauvoei, C. septicum, C. novyi and C. perfringens).

The commercial immunizings were evaluated with respect to sterility (bacterins), innocuity and direct-challenge test with C. chauvoei and C. septicum in mice.

9.1. Sterility and Innocuity

All the commercial bacterins were found to be sterilized. Vaccines and bacterins were satisfactorily innocuous.

9.2. Potency Testing

The evaluation potency testing challenging C. chauvoei were made in mice for the comparison of the 50% protection dosage using standard bacterins produced by author. Only one injection intra-peritoneally was given. Two weeks later, they were challenged with a 100% lethal dose stored at -20° C. The vaccine (living spores) demonstrated the best results when compared to the standard bacterin; two bacterins similar and three others exhibited inferior protection.

The attempt to produce a standard bacterin from C. septicum were not resolved satisfactorily. The potency test of commercial bacterins hasn't showed anything of the level of protection against this germ.

9.3. Substitution of Guine Pigs for Mice

This substitution has shown to be viable, without any apparent limitations and also, with economical advantages.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGA, A. Soros, vacinas, alérgenos e imunógenos. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, SIA, 1942. v. 3, 247p.
- BRAGA, A. Soros, vacinas, alérgenos e imunógenos. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, SIA, 1943. v. 4, 54p.
- BRITISH Veterinary Codex. London, Pharmaceutical Press, 1970. 317p.
- BROWN, K.K; PARIZEK, R.E.; STEWART, R.C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with multivalent bacterin-toxoids. Vet. Med. Small Anim. Clin., Bonner Springs, 71(12): 1717-22, 1976.
- CHOMAN, B.R.; COOPER, M.S.; MARTINI, B.S. Direct challenge potency test for bacterins containing Clostridium sep-

- ticum. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29(3):679-83, 1968.
- CLAUS, K.D. & MACHEAK, M.E. Preparation of Clostridium chauvoei antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(5):1045-52, 1972.
- COELHO, W.P. Comunicação pessoal. 1974. (Pfizer Química Ltda., São Paulo, Brasil).
- COOPER, M.S.; MARTINI, I.V.; PERSONEUS, G.R. Further Studies on Clostridium chauvoei infections and immunity laboratory animal. Cornell Vet., Ithaca, 50(3):301-8, 1960.
- FIGUEIREDO, J.B. Comunicação pessoal. 1974. (Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Brasil).
- GODOY, A. Nova vacina contra o Carbúnculo Sintomático. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2(1):11-21, 1910.
- KERRY, J.B. A note on the occurrence of Clostridium chauvoei in the splens and liver of normal cattle. Vet. Rec., London, 76(14):396-7, 1964.
- LYRA, T.M.P. Comunicação pessoal. 1974. (Divisão de Defesa Sanitária Animal, Ministério da Agricultura, Brasília, DF, Brasil).

- MACHEAK, M.E.; CLAUS, K.D.; MALOY, S.E. Potency testing Clostridium chauvoei containing bacterins: relationship of agglutination titers and potency test in cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(5):1053-8, 1972.
- MACHEAK, M.E.; CLAUS, K.D.; MALOY, S.E. Potency testing Clostridium novyi containing bacterins: comparison of immunologic response in guinea pigs and sheep. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(6):1201-8, 1972.
- MÁRIO, R.O. Concentração de imunigénios de Clostridium chauvoei por cultura em diálise. Vet. Mocamb., Lourenço Marques, 2(2):61-136, 1969.
- MASON, J.H. & SCHEUBER, J.R. The production of immunity to Clostridium chauvoei. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind., Pretoria, 2(1):143-5, 1936.
- MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for Clostridium septicum and Clostridium chauvoei. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 22(2):341-50, 1959.
- REED, L.J. & MULNCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3):493-7, 1938.
- ROBERTS, R.S. Clostridial diseases. In: STABLEFORTH, A. W. & GALLOWAY, I.A. Infectious diseases of animal. Diseases due to bacteria. London, Butterworths, 1959. p. 160-228.

- RYFF, J.F. & LEE, A.M. Blackleg immunity. J. Am. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 111(847):283-8, 1947.
- RODRIGUES, C. Estudo sobre a manqueira. Etiologia e diagnóstico. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 10:1-30, 1939.
- RODRIGUES, C. Estudo sobre a manqueira. Do preparo e controle da vacina formolada. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 16:217-306, 1945.
- PERSONEUS, G.R.; COOPER, M.S.; MARTINI, F.V. Studies on blackleg bacterins. Immunity test in laboratory animal. Cornell Vet., Ithaca, 47(3):361-71, 1957.
- SIEIRO, F. & ASTARLOA, F. A potency test in Guinea pigs for the evaluation of Clostridium chauvoei bacterins. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 25(109):1785-7, 1964.
- SMITH, L.D.S. & HOLDEMAN, L.V. The pathogenic anaerobic bacteria. Springfield, C.C. Thomas, 1968. 423p.
- THOROLD, P.W. The immunity to Clostridium chauvoei produced by vaccine prepared from cellophane sac cultures. Br. Vet. J., London, 109(7):302-9, 1953.
- VIANNA, W.O. Comunicação pessoal. 1974. (Instituto Biológico de São Paulo - Av. Rodrigues Alves, 1252 - São Paulo, Brasil).