

**Edisio Oliveira de Azevedo**

**Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Medicina Veterinária.  
Área: Medicina Veterinária Preventiva  
Orientador: Prof. Francisco Carlos  
Faria Lobato**

**Belo Horizonte - MG  
UFMG - Escola de Veterinária  
1997**

A994a Azevedo, Edisio Oliveira de, 1965-

Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D / Edisio Oliveira de Azevedo. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1997.

57p. : il.

Dissertação ( mestrado )

1. Clostridiose - Vacinas - Teses

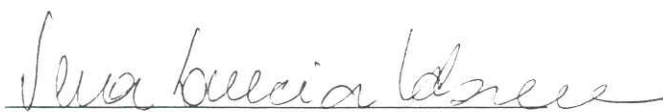
I. Título.

CDD. 616 . 931

Dissertação defendida e aprovada em 17/02/97, pela Comissão Examinadora constituída por



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Orientador



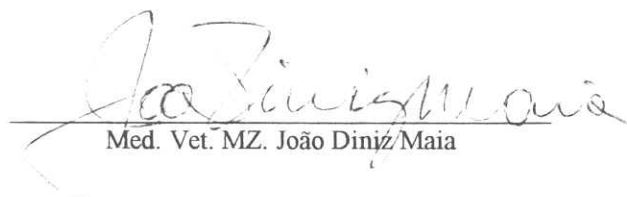
Profª Vera Lúcia Viegas de Abreu



Prof. Pedro Lúcio Lithg Pereira



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Med. Vet. MZ. João Diniz Maia

Aos meus pais, Pedro e Davina,  
que tornaram possível minha  
existência.

A meus irmãos, pelo exemplo de  
companheirismo e amizade.

À Marcia, minha esposa, e a  
Lucas, claro.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Carlos Faria Lobato, por sua constante orientação, amizade, companheirismo e pela dedicação e compromisso com a vida acadêmica.

À Prof. Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela orientação, disponibilidade e sensatez.

Ao Prof. Pedro Lúcio Lithg Pereira, pela participação no comitê de orientação.

Aos colegas João Diniz Maia e Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, pelas valiosas sugestões e constante colaboração para realização deste trabalho.

Ao departamento de medicina veterinária da Universidade Federal da Paraíba, por ter-me concedido liberação para realização do curso e em especial, aos colegas Marcia Almeida de Melo, Carlos Enrique Peña Alfaro, Jeferson Azevedo Neto, Sônia Maria de Lima, Melânia Loureiro Marinho e Ivon Macêdo Tabosa, pelo esforço, solidariedade e companheirismo.

Aos colegas Geraldo Márcio e Anna Christina, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas e amigos do LARA-PL, em especial a Pedro Mota, Anapolino, Ângela, Sérgio Menicucci, Massami, Rosilene, João Curadares, Ercílio, Ailton, Armando, Beth, João Prado, Paulinho, Dulce e Clélio, pela irrestrita ajuda, apoio e saudável convivência.

Ao Dr. Tomaz de Aquino Porfirio, diretor do LARA-PL, pelo apoio ilimitado oferecido para realização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Celina Modena pelo apoio demonstrado nos momentos de dificuldades.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelos momentos de alegria, respeito e espírito ético, demonstrados no decorrer do curso.

Aos companheiros Miro/Dica, Roberto/Oneide e Pedro/Simone, pelas sugestões, amizade e apoio.

À nação nordestina da UFMG, pela união e alegria.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À todos que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## OS ESTATUTOS DO HOMEM

(...) “Fica decretado que todos os dias da  
[semana,  
inclusive as terças-feiras mais cinzentas,  
têm direito de converter-se em manhãs de  
[domingo.

(...)

Fica permitido que o pão de cada dia  
tenha no homem o sinal de seu suor.  
Mas que sobretudo tenha sempre  
o quente sabor da ternura.

(...)

Decreta-se que nada será obrigado nem  
[proibido.  
Tudo será permitido,  
inclusive brincar com os rinocerontes  
e caminhar pelas tardes  
com uma imensa begônia na lapela.

Só uma coisa fica proibida:  
amar sem amor”.

(...)

*Thiago de Mello*

**SUMÁRIO**

	pág.
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>21</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	pág.
TABELA 1 - Titulação de beta toxina produzida por <i>C. perfringens</i> tipo C (ATCC 3628), de acordo o meio de cultura, o controle de pH e o período de incubação utilizados	36
TABELA 2 - Titulação de épsilon toxina produzida por <i>C. perfringens</i> tipo D (ATCC 3629), de acordo o meio de cultura, o controle de pH e o período de incubação utilizados	37
FIGURA 1 - Variação do pH do meio Al Saadi modificado durante a produção de beta toxina por <i>Clostridium perfringens</i> tipo C (ATCC 3628)	38
FIGURA 2 - Variação do pH do meio Al Saadi modificado durante a produção de épsilon toxina por <i>Clostridium perfringens</i> tipo D (ATCC 3629)	38
TABELA 3 - Tipificação das toxinas inoculadas por via intradérmica em cobaios e endovenosa em camundongos	39
FIGURA 3 - Reação intradérmica em cobaio, 48 horas após a inoculação de beta toxina em diferentes diluições com 1,0 UI de antitoxina beta	40
FIGURA 4 - Reação intradérmica em cobaio, 48 horas após a inoculação de épsilon toxina em diferentes diluições com 1,0 UI de antitoxina épsilon	41

TABELA 4 -	Níveis de antitoxinas beta e épsilon em "pool" de soros de coelhos, coletados aos 14, 21 e 28 dias após a vacinação com vacinas polivalentes contendo <i>C. perfringens</i> tipos C e/ou D, ao nível de L+ para beta toxina e L <sup>+</sup> / <sub>10</sub> para épsilon toxina.	43
TABELA 5 -	Soroproteção em camundongos inoculados com 2.5 DL <sub>50</sub> de beta toxina e soro de caprinos, coletados em diferentes períodos após a vacinação com vacinas polivalentes contendo <i>C. perfringens</i> tipos B e/ou C e D	44
FIGURA 5 -	Níveis de antitoxina beta em "pool" de soros de coelhos, coletados aos 14, 21 e 28 dias após a vacinação com a vacina A e toxóide padrão	45
FIGURA 6 -	Níveis de antitoxina épsilon em "pool" de soros de coelhos, coletados aos 14, 21 e 28 dias após a vacinação com a vacina A e toxóide padrão	45
TABELA 6 -	Soroproteção em camundongos inoculados com 5 DL <sub>50</sub> de épsilon toxina e soro de caprinos, coletados em diferentes períodos após a vacinação com vacinas polivalentes contendo <i>C. perfringens</i> tipos B e/ou C e D	46
TABELA 7 -	Títulos de antitoxinas beta e épsilon em "pool" de soros de caprinos imunizados com a vacina E, coletados em diferentes períodos	47

## RESUMO

Sete vacinas comerciais contra clostridioses, que continham em sua composição toxóides de *Clostridium perfringens* tipos C e/ou D, foram avaliadas quanto à esterilidade, inocuidade e eficiência. Seis vacinas foram produzidas no Brasil e uma foi importada. Como controle dos testes, empregou-se um toxóide bivalente padrão de *C. perfringens* C e D. Todas as vacinas testadas foram estéreis quando semeadas em meios para pesquisa de bactérias e fungos e mostraram-se inócuas quando administradas por via intraperitoneal em camundongos. Quanto à eficiência, determinada pelo teste de soro-neutralização em camundongos a partir do "pool" de soros de coelhos imunizados, a vacina importada e o toxóide padrão, apresentaram títulos de anticorpos séricos superiores aos níveis mínimos exigidos de 10 e 5 UI/mL para as toxinas beta e épsilon, produzidas por *C. perfringens* tipos C e D, respectivamente. As vacinas produzidas no Brasil foram ineficientes em estimular níveis sorológicos de beta e épsilon antitoxinas compatíveis com os níveis de teste recomendados para controle destes produtos. Quatro dos seis toxóides de origem nacional, testados em caprinos, não apresentaram níveis de antitoxinas detectáveis com os níveis de testes de L+ ou L+<sub>10</sub> para beta e épsilon toxinas, respectivamente. As toxinas utilizadas para realização dos testes foram produzidas em membrana de diálise.

Palavras-chave: Vacinas, Toxinas, *C. perfringens*, Enterotoxemia

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos anaeróbios, formadores de esporos, de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado no solo, pastagens, água doce e salgada, alimentos de origem vegetal e animal e como habitante normal do trato digestivo dos animais e do homem. Dentre as espécies de importância médica e veterinária está *Clostridium perfringens*, causador de enterite necrótica, enterotoxemia, gangrena gasosa e intoxicação alimentar em animais e no homem (Sterne & Warrack, 1964; Sterne, 1981).

Dentre as doenças causadas por *C. perfringens* tipo B, C e D, as enterotoxemias merecem destaque pela capacidade de provocar morte, principalmente em animais mais jovens, ou por retardo no crescimento daqueles que sobrevivem à infecção, determinando consideráveis perdas econômicas aos criadores. O fato da maior susceptibilidade dos animais recém-nascidos deve-se à presença de substâncias inibidoras de tripsina no colostro e leite nos primeiros dias pós-parto.

*C. perfringens* tem sido descrito em diferentes países, como causa de mortalidade em suínos, ovinos, caprinos, caninos, bovinos, equinos (Keast & Mc Barron, 1954; Griesemer & Krill, 1962; Blackwell & Butler, 1992; Devriese et al., 1993; Fujita et al., 1994). No Brasil, *C. perfringens* foi isolado de casos de enterotoxemias, sendo a maioria diagnosticados em animais com menos de um mês de idade. Os autores isolaram também *C. perfringens* de animais que morreram com sinais clínicos de manqueira, principalmente dos casos que apresentaram lesões necróticas hepáticas, além das lesões subcutâneas (Correa et al., 1980).

Cerca de 16 fatores de virulência são produzidos por *C. perfringens*, entre os quais 12 toxinas. De acordo com a capacidade de produzir uma das quatro toxinas de maior poder patogênico – alfa, beta, épsilon e iota, *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A, B, C, D e E), responsáveis por doenças específicas.

A toxina alfa é produzida pelos cinco tipos, mas principalmente por *C. perfringens* tipo A, que é o mais comumente encontrado, porém sua

patogenicidade não está completamente esclarecida (Niilo, 1980). A alfa toxina pode causar hemólise e necrose, dependendo do tecido afetado. *C. perfringens* tipo A é responsável por intoxicações alimentares, gangrena gasosa e infecções em humanos, enterite necrótica em aves, ovinos e no homem e também tem sido incriminado por enterotoxemia em suínos, ovinos, equinos e bovinos (Sterne, 1981; Estrada et al., 1989; Estrada & Taylor, 1989).

A beta toxina produzida por *C. perfringens* tipos B e C é altamente sensível à tripsina o que leva a sua rápida destruição no intestino delgado de indivíduos e animais sadios (Rood & Cole, 1991). Sua atividade biológica é letal e necrótica, ocorrendo quando a quantidade de enzimas proteolíticas estão em baixas concentrações no trato digestivo (Niilo, 1980). *C. perfringens* tipo B provoca enterotoxemias principalmente em cordeiros e às vezes em bezerros e potros, nos primeiros dias de vida. *C. perfringens* tipo C causa enterotoxemia em ovinos jovens e adultos e em bezerros, e enterite necrótica em leitões e no homem (Sterne, 1981; El Idrissi et al., 1992).

A toxina épsilon é elaborada em forma de protoxina por *C. perfringens* tipo D, necessitando da ação de enzimas proteolíticas para ser ativada, pela retirada de um aminoácido da porção amino terminal da protoxina (Rood & Cole, 1991). A toxina épsilon tem ação necrótica e letal, provocando aumento da permeabilidade intestinal, edema em vários órgãos, hidropericárdio e lesões renais (Niilo, 1980). A enterotoxemia é a principal doença causada por *C. perfringens* tipo D em ovinos, caprinos e bovinos submetidos a fatores que alteram a microbiota intestinal, como mudança brusca de alimentação e estresse pós desmame, com morte súbita após o início dos sintomas (El Idrissi et al., 1992). A toxina iota é produzida por *C. perfringens* tipo E em forma de protoxina e quando ativada por enzimas proteolíticas, causa enterotoxemia em ovinos, bovinos e enterite necrótica em coelhos (Niilo, 1980; Sterne, 1981; Rood & Cole, 1991).

O diagnóstico preciso do tipo envolvido nos processos patológicos, em determinada região geográfica, facilita a adoção de medidas preventivas adequadas, como por exemplo, a vacinação tipo-específica, possibilitando um aumento de sua eficiência (Pivnick et al., 1964). Determinados fatores predis põem os animais às enterotoxemias. Em ruminantes, alimentação rica em carboidratos e com baixo teor de fibra bruta, provoca degeneração e calosidade das vilosidades do rúmen e inabilidade de sua flora em quebrar suficientemente os carboidratos. O excesso de carboidratos no duodeno, especialmente glicose e frutose, estimula o crescimento de *C. perfringens* residente e conseqüentemente, produção de toxinas. (Seifert et al., 1984)

Na maioria das vezes, enterotoxemia por *C. perfringens* afeta animais entre três dias e seis meses de idade, porém, na região centro-oeste do Brasil, a doença

tem sido diagnosticada em maior intensidade em bovinos adultos, sendo *C. perfringens* tipo D o mais frequentemente envolvido no processo (Silveira et al., 1995). A ocorrência de mortes súbitas em cabras em lactação foi descrita por Baldassi et al. (1995), com isolamento de *C. perfringens* e recuperação de toxina termolábil e letal, a partir do conteúdo gástrico e intestinal dos animais afetados. Na Argentina, Uzal et al. (1994) isolaram *C. perfringens* tipo D em cultura pura, a partir de tecido renal e conteúdo intestinal de caprinos adultos acometidos por um surto de enterotoxemia.

Por seu caráter agudo e dificuldade de tratamentos eficazes, medidas preventivas devem ser adotadas para o controle de doenças causadas por *C. perfringens*. Levando-se em consideração o regime de criação, o número de animais e o manejo. A vacinação com toxóides polivalentes é a principal medida adotada, podendo ser iniciada em qualquer época do ano, observada as condições gerais do rebanho. Uma série de fatores pode alterar a resposta à vacinação, desde a qualidade da alimentação do rebanho à composição das vacinas. Dieta suplementada com vitamina E aumentou a resposta imune humoral de ovinos vacinados com toxóide tipo D (Tengerdy et al., 1983).

A evolução da doença em animais jovens é quase sempre de caráter agudo ou super-agudo, dificultando qualquer medida terapêutica. Entretanto, o processo pode ser prevenido através da imunização com vacinas monovalentes ou polivalentes. No Brasil, vacinas polivalentes contra clostridioses são produzidas por laboratórios privados, com diferentes associações entre tipos de *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novy*. Destes constituintes, apenas *C. chauvoei* é submetido a controle de potência, realizado desde 1986, pelo Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento – LARA/MAA em Porto Alegre-RS. Em relação ao *C. perfringens*, três laboratórios produzem toxóides com tipos B, C e D, dois laboratórios produzem com tipo C, dois laboratórios com tipo D, um laboratório com tipo A, um laboratório com tipos C e D e um laboratório com tipos B e D. No período de 1991 a 1996, cerca de 320 milhões de doses de vacinas polivalentes foram apresentadas para controle, comprovando a grande utilização destas vacinas pelos produtores.

Em pesquisa realizada para verificar a eficiência de vacinas contra botulismo, uma das mais importantes clostridioses em bovinos, foi demonstrado que os toxóides foram pouco eficientes para estimular a produção de anticorpos nos animais inoculados (Lobato, 1989). Estes dados revelam uma parcela da qualidade dos imunógenos nacionais e à medida que outras vacinas sejam testadas resultados semelhantes podem aparecer. Por outro lado, o controle oficial destas vacinas permitirá que produtos de melhor qualidade sejam fornecidos ao mercado consumidor. O estabelecimento do acordo de Mercado Comum do Cone Sul, MERCOSUL, impõe aos países membros uma tomada de

posição mais enérgica em relação ao controle de qualidade dos insumos agropecuários e produtos biológicos, sobretudo em função do intercâmbio comercial que deverá ocorrer entre estes países.

Este trabalho teve como objetivos produzir toxinas beta e épsilon de *C. perfringens* e testar a inocuidade, esterilidade e potência de vacinas polivalentes que continham em sua composição *C. perfringens* tipo C e/ou D, disponíveis para comercialização no mercado brasileiro.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

A produção de toxinas por *C. perfringens* é um dos aspectos mais importantes a ser considerado na linha de produção de vacinas, principalmente a toxina beta e toxina épsilon, por serem as mais comumente encontradas como causa de doenças nos animais domésticos. A obtenção de toxóides eficientes está diretamente relacionado com o nível de toxina obtido "in vitro" (Pivnick et al., 1964). Variações na composição do meio, na amostra utilizada e no tempo de incubação tem sido avaliado por diversos pesquisadores, com reflexo nos resultados obtidos.

A presença e o tipo de carboidratos no meio de cultura, como fonte de energia pode influenciar o crescimento e a produção de toxinas. Concentrações de glicose entre 1,0 e 2,0% apresentaram os melhores resultados. Níveis superiores a 2% de glicose não aumentaram a produção de toxinas (Jansen, 1961; Kulshrestha, 1973; Pal et al., 1990). A adição de glicose, sucrose ou dextrina aumentou o título de beta toxina (Sakurai & Duncan, 1979). A adição de 0,5% de L-cisteína hidrocloreídrica, 0,5% de dextrina e 0,01% de amido ao meio de cultura estimula a produção de beta toxina. Meios de cultura contendo carboidratos favorecem a produção de gases como o H<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub>, que por sua vez ajudam a manutenção do ambiente em anaerobiose (Rood & Cole, 1991)

O período de incubação também deve ser considerado na produção e estabilidade das toxinas. A beta toxina quando mantida a 37 °C por um período superior a quatro horas após a completa fermentação, perdeu 90 a 99% de sua toxidez, possivelmente em função da ação de outros produtos enzimáticos sintetizados pela própria bactéria (Pivnick et al., 1964). O período de incubação ideal para produção de toxinas têm sido investigado, variando de quatro a 24 horas para beta toxina e de cinco horas a cinco dias para épsilon toxina. Contudo, os melhores resultados são obtidos quando a fermentação se completa, o que ocorre entre quatro e oito horas para *C. perfringens* tipo C e entre cinco e 12 horas para *C. perfringens* tipo D (Pivnick et al., 1964; 1965; Habeeb, 1969; Kulshrestha, 1973; Al Saadi, 1977; Sakurai et al., 1979).

Níveis de toxina variam de acordo com a amostra e o meio de cultura empregados para a produção. Jansen (1961) trabalhando com uma amostra

rugosa de *C. perfringens* tipo B produziu títulos de 251 Lf/mL<sup>1</sup> de filtrado de beta toxina quando o meio de cultura continha partículas de carne (50% do volume), peptona (2 %), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (0,28 %), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,13 %), glicose (1 %), incubados a 37°C por quatro horas. Dholakia et al. (1980) utilizaram meio de cultura preparado com infusão de carne e fígado de bezerras adicionado de peptona (2 %), NaCl (0,5 %), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,4 %) e glicose (0,5 %), com pH ajustado inicialmente para 8,4 e mantido entre 6,5 e 7,2 às quatro e oito horas de incubação, e obtiveram título de 2,0 x 10<sup>3</sup> DML/mL (menor quantidade de toxina que mata 100% dos animais inoculados, até 72 horas após a inoculação) de épsilon toxina. El Idrissi & Ward (1992) utilizando *C. perfringens* tipos C e D (amostras ATCC 3628 e 3629), obtiveram, respectivamente títulos de 3,2 x 10<sup>2</sup> e 1,02 x 10<sup>3</sup> DML/mL de beta e épsilon toxinas. Estas toxinas foram produzidas em fermentadores com pH controlado automaticamente, por um período de incubação de cinco a seis horas. Em seguida, as toxinas foram precipitadas com sulfato de amônio e purificadas em colunas de DEAE-Sephacel e Sepharose.

Dentre os pontos críticos para a produção de toxinas, o controle do pH do meio de cultura é um dos mais importantes. *C. perfringens* cresce bem, mesmo em culturas sem controle de pH, entretanto, para a produção de toxinas, o pH deve ser mantido entre 6,5 e 8,0. Títulos de 2,0 a 10 x 10<sup>4</sup> DML/mL de beta toxina foram produzidos por Pivnick et al. (1964) quando o pH foi controlado em 7,6 ± 0,1. Para produção de épsilon toxina, títulos de 2,0 x 10<sup>3</sup> a 12 x 10<sup>4</sup> DML/mL, foram obtidos quando o pH foi controlado em 7,2 ± 0,1 por um período de incubação de 10 horas (Pivnick et al., 1965). Kulshrestha (1973) avaliando o efeito do pH sobre a produção de beta e épsilon toxinas constatou que os títulos foram duas a três vezes maiores quando o pH foi controlado em 7,6 e 7,0 respectivamente e a variação do pH durante o crescimento ativo foi maior no cultivo de *C. perfringens* tipo C (7,6 para 4,0) do que no tipo B (7,6 para 5,2) após quatro horas de incubação. Pal et al. (1990) utilizando uma amostra de *C. perfringens* tipo B, incubado por um período de 4 horas, com o pH controlado em 7,4 obtiveram títulos de 6,0 x 10<sup>3</sup> DML/mL de toxina.

A produção de toxinas pode ser realizada em membrana de diálise submersa em meio de cultura. Assim, as substâncias de baixo peso molecular são liberadas para o meio, enquanto aquelas com peso molecular superior ao tamanho dos poros da membrana são retidas em seu interior. Al Saadi (1977), utilizando esta metodologia, obteve títulos de 2,0 x 10<sup>4</sup> DML/mL de beta toxina e 8,0 x 10<sup>3</sup> DML/mL de épsilon toxina, quando o pH foi corrigido para 7,6 e 7,2 respectivamente, a cada 60 minutos. O período de incubação foi de oito horas para produção de beta toxina e 12 horas para épsilon toxina.

<sup>1</sup> Lf = nível de floculação. Cada 1,0 Lf corresponde a 1,0 UI

A concentração de toxinas produzidas normalmente tem sido utilizada como recurso para aumentar os títulos obtidos nos diversos processos de produção e para facilitar a purificação. Dentre os procedimentos para concentrar toxinas, a precipitação com sulfato de amônio em diversas concentrações tem sido utilizada. Cerca de 80 % da atividade tóxica pode ser recuperada quando precipitada com solução de 30 - 50 % de sulfato de amônio (Jansen, 1961; Habeeb, 1969; Worthington et al., 1973; Sakurai & Duncan, 1977).

Seifert et al. (1984), concentraram toxinas através de ultra-filtração. Inicialmente, a cultura foi filtrada em membrana com poros de 0,45 a 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, para retenção da massa bacteriana e esporos; em seguida, nova filtração foi realizada de forma que partículas com peso molecular superior a 10 Kilodaltons (kDa) fossem retidas. As membranas com o material retido foram tratadas para recuperação da toxina. Uma metodologia simples para concentração de toxinas pode ser executada mediante diálise contra polietilenoglicol (Al Saadi, 1977; Estrada et al., 1989).

A European Pharmacopoeia (1993) estabelece que a toxina a ser utilizada na avaliação da potência de vacinas contra *C. perfringens* tipo C e D deve ser padronizada ao nível de teste de L+ para beta toxina e L+/<sub>10</sub> para épsilon toxina (L+ e L+/<sub>10</sub> (menor quantidade de toxina que quando misturada com 1,0 e 0,1 UI de antitoxina homóloga, mata 50 % dos animais inoculados, respectivamente, até 72 horas após a inoculação). Com estes níveis de teste, os menores valores de antitoxinas beta e épsilon, possíveis de serem determinados é de 10 e 1,0 UI/mL, respectivamente, uma vez que utiliza-se uma dose teste dez vezes maior para cada toxina homóloga.

Níveis de teste podem variar de acordo com a quantidade de anticorpo a ser titulado. Lobato (1989) avaliando a potência de vacinas antitubulínicas reduziu o nível de teste de L+ para L+/<sub>10</sub> em função dos testes preliminares dos soros dos animais vacinados terem apresentado níveis baixos de anticorpos. Webster & Frank (1985) utilizaram uma dose teste de toxina épsilon ao nível de L+/<sub>4</sub> para titular soros de animais vacinados com uma vacina polivalente. Kennedy et al. (1977b) avaliaram níveis de beta antitoxina com uma dose teste da toxina homóloga ao nível de L+/<sub>2</sub>.

A resposta à vacinação pode variar de acordo com a espécie animal imunizada. Animais de laboratório, como cobaias e coelhos podem ser utilizados para testar potência de vacinas destinadas a outras espécies. Webster & Frank (1985) compararam a resposta de coelhos e ovinos vacinados com duas doses de uma vacina polivalente, constituída de *C. perfringens* tipo D, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* tipo B e *C. tetani* e obtiveram níveis de antitoxina épsilon de

26,9 UI/mL de soro em ovinos e 12,0 UI/mL de soro em coelhos, através da soro-neutralização em camundongos.

A utilização de adjuvantes nas vacinas estimula a resposta imunológica. Dholakia et al. (1980), compararam a eficácia de três vacinas contra *C. perfringens* tipo D em coelhos e verificaram que o grupo de animais que recebeu duas doses de uma vacina sem adjuvante apresentou títulos de 4,0 UI de antitoxina épsilon/mL de soro, dez dias após a vacinação, enquanto que os grupos imunizados uma única dose de um toxóide precipitado com alumínio e outro toxóide precipitado com alumínio e adsorvido com hidróxido de alumínio apresentaram, dez dias após a vacinação, títulos de 6,0 e 10,0 UI de antitoxina épsilon/mL de soro, respectivamente. Quando duas doses do toxóide adsorvido com hidróxido de alumínio foi utilizado em ovinos, os títulos de antitoxina épsilon obtidos foram de 6,0 e 1,0 UI/mL de soro, 30 e 60 dias após a vacinação, respectivamente. Os melhores títulos de antitoxina épsilon foram obtidos por Jansen (1967) quando uma segunda dose de toxóide contendo 90 Lf de antígeno foi administrado duas a seis semanas após o estímulo inicial.

O volume e o número de doses é importante na consolidação da resposta imune. Kerry & Craig (1979) verificaram que ovinos vacinados com uma dose de 5 mL seguida por uma de 2 mL apresentaram títulos mais altos que os vacinados com duas doses consecutivas de 2 mL. Kennedy et al. (1977a), vacinaram bovinos com toxóide de *C. perfringens* tipo C e verificaram que títulos de 17,5 a 20,0 UI de antitoxina beta, duas semanas após a primeira dose, elevaram-se para 50 a 90 UI/mL, duas a quatro semanas após a segunda dose, confirmando a necessidade da segunda dose vacinal. Os autores observaram ainda que os títulos de antitoxina beta em bovinos foi 4 a 5 vezes maiores que em ovinos.

Kumar et al. (1992) compararam a resposta de caprinos vacinados com uma e duas doses de um toxóide adsorvido com hidróxido de alumínio e de um toxóide adsorvido com hidróxido de alumínio, adicionado de vitamina E e arlcel A e observaram que os animais vacinados com duas doses de cada toxóide apresentaram títulos três vezes maiores que aqueles vacinados com dose única e que não houve diferença significativa entre os toxóides utilizados.

Sterne et al. (1962), imunizaram ovinos com uma vacina polivalente contendo *C. perfringens* tipo B, C e D; *C. septicum*; *C. oedematiens*; *C. tetani* e *C. chauvoei* e observaram que os animais apresentaram níveis de antitoxinas protetoras 25 dias após a primeira dose e títulos ainda maiores 11 a 12 dias após o "booster", conferindo uma sólida imunidade ao rebanho. Apenas o título de *C. oedematiens* estava abaixo do mínimo exigido, porém com níveis protetores.

Cameron (1980) verificou que a vacinação de cordeiros aos dois meses de idade com uma dose de toxóide, adsorvido com adjuvante oleoso, seguida por uma

dose de toxóide precipitado com alumínio, quatro semanas após, estimulou produção de títulos maiores do que quando utilizou duas doses seguidas de toxóide com adjuvante oleoso. Verificou ainda que a resposta em ovinos adultos foi maior que em cordeiros aos três meses de idade.

Uma análise econômica do efeito da vacinação sobre a mortalidade em 18.896 bovinos, criados em confinamento, foi realizada por Knott et al. (1985). Os autores administraram duas doses de uma vacina comercial contra clostrídios, com intervalo de 30 dias entre as doses e constataram a ocorrência de 322 mortes no grupo vacinado contra 611 no grupo controle.

Green et al. (1987) avaliaram através de ELISA, a resposta de três vacinas em ovinos e caprinos e constataram que não houve diferença significativa na titulação dos níveis de anticorpos dos ovinos aos 14 e 28 dias, contudo, em caprinos, apenas duas vacinas apresentaram aumento de títulos significativos 14 dias após a vacinação e aos 28 dias não houve diferença entre os grupos vacinados e o grupo controle. Frerichs & Gray (1975) obtiveram títulos mais altos em coelhos que em ovinos. Kennedy et al., (1977b) conseguiram títulos de 40 a 55 e de 50 a 60 UI de antitoxina beta em coelhos e bovinos, respectivamente

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de realização do trabalho

O experimento foi realizado no Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura e Abastecimento, em Pedro Leopoldo (LARA/PL/MAA) no Estado de Minas Gerais (MG); no laboratório de doenças bacterianas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - EV/UFMG e em uma propriedade rural do Município de Sabinópolis - MG.

#### 3.2. Aquisição e identificação das vacinas

Foram testadas vacinas polivalentes contra clostrídeos, que apresentavam em sua composição *C. perfringens* tipo C e/ou D, sendo seis partidas nacionais e uma importada e como controle um toxóide<sup>1</sup> bivalente padrão. As vacinas nacionais foram adquiridas no comércio, a importada e o toxóide padrão foram fornecidos pelo LARA-PL, observando-se o prazo de validade de cada uma e conservadas de acordo com as especificações dos fabricantes. Todas as vacinas continham hidróxido de alumínio como adjuvante. Cada laboratório foi identificado como descrito abaixo.

---

<sup>1</sup> Toxóide produzido pelo Central Veterinary Laboratory (Inglaterra)

## Composição das vacinas testadas

VACINA	ORIGEM	COMPOSIÇÃO
A	Importada	<i>C. perfringens</i> A, B, C e D; <i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> B; <i>C. tetani</i>
B	Nacional	<i>C. perfringens</i> C; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i>
C	Nacional	<i>C. perfringens</i> B, C e D; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i>
D	Nacional	<i>C. perfringens</i> B, C e D; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i>
E	Nacional	<i>C. perfringens</i> B e D; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. sordellii</i>
F	Nacional	<i>C. perfringens</i> C e D; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i>
G	Nacional	<i>C. perfringens</i> B, C e D; <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i>
CVL	Importada	toxóide beta e épsilon

## 3.3. Animais utilizados

## 3.3.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 e 22 g, fornecidos pelo biotério do LARA/MAA/PL.

## 3.3.2. Cobaíes

Utilizaram-se cobaíes de ambos os sexos, pesando entre 250 e 350 g, fornecidos pelo biotério do LARA/MAA/PL.

## 3.3.3. Coelhos

Para o teste de potência foram utilizados coelhos machos, com peso entre 1,5 e 2,5 Kg. Os animais foram adquiridos da fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa, da UFMG.

### 3.3.4. Caprinos

Foram utilizadas cabras da raça saanen, entre oito e 12 meses de idade, mantidas em confinamento durante todo período do experimento, em uma propriedade na zona rural do município de Sabinópolis-Minas Gerais.

### 3.4. Amostras e antitoxinas

Para produção das toxinas empregadas nos testes de eficiência, foram utilizadas amostras de *C. perfringens* tipo C (amostra 3628) e tipo D (amostra 3629) da American Type Culture Collection (ATCC) e amostras de antitoxina beta padrão com 4770 UI/mL e antitoxina épsilon padrão com 1020 UI/mL, do Central Veterinary Laboratory (CVL), fornecidas pelo LARA-PL.

### 3.5. Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Cooked Meat Medium - CMM<sup>1</sup>, Reinforced Clostridial Medium - RCM<sup>1</sup>, Agar sangue - AS<sup>2</sup>, Agar Sahid Ferguson Perfringens - SFP<sup>2</sup>, meio de Tarozzi, meios descritos por Jansen (1961), Al Saadi (1977) e Pal et al. (1990). Os meios comerciais (CMM, RCM, SFP e AS) foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. O meio descrito por Al Saadi (1977) foi modificado pela adição de tiamina<sup>2</sup> (0,5%), L-cisteína hidrocloreídrica<sup>2</sup> (0,5%), glicose<sup>2</sup> (1%), amido solúvel<sup>2</sup> (0,03%), substituição da N-Z-Amina B por N-Z-Amina A<sup>3</sup> (2%). Todos os meios foram autoclavados a 121°C, por 20 minutos. A glicose, tiamina e L-cisteína hidrocloreídrica foram filtradas em millipore<sup>4</sup> com membrana de 0,22 µm de porosidade e adicionadas ao meio no momento do uso. Os meios de cultura e os reagentes foram fornecidos pelo LARA-PL.

### 3.6. Produção de toxinas

Para o preparo do inóculo as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,0 mL de RCM ou CMM e transferidos para cinco tubos de ensaio (16x160 mm) com tampa de rosca contendo 10 mL de meio de cultura e incubados por 24 horas. Após esse período, as culturas foram semeadas em AS e SFP e incubados

<sup>1</sup> Oxoid - USA, Columbia, MD

<sup>2</sup> E. MERCK - 64271 Darmstadt, Germany

<sup>3</sup> Sigma Chemical Company

<sup>4</sup> Millipore Corporation

por 24 horas. Dos meios sólidos, as colônias características de *C. perfringens* foram transferidas para cada um dos meios empregados para produção de toxinas e incubadas por 16 horas (Habeeb, 1969; Sakurai & Duncan, 1977; Pal et al., 1990). Todas as incubações foram realizadas em jarras de anaerobiose<sup>1</sup> com mistura gasosa<sup>1</sup> contendo 10% de CO<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 80% de N<sub>2</sub> e mantidas a 37°C.

A produção de toxina segundo Al Saadi (1977), foi realizada em membrana de diálise com capacidade de retenção de substâncias com peso molecular superior a 12 Kdaltons (KDa). Para cada 3000 mL de meio de cultura, 450 mL de água destilada estéril e 50 mL de inóculo foram utilizados da seguinte forma: O meio de Al Saadi (1977) modificado foi acondicionado em recipiente de boca larga, provido de tampa com quatro saídas, uma para coleta do meio, uma para ajuste do pH e duas para introdução do inóculo e saída de gás. O meio de cultura e a água destilada foram incubados separadamente a 37°C, por um período de 24 horas, para que no momento da inoculação a temperatura estivesse adequada. O inóculo e a água destilada estéril foram transferidos para membrana de diálise e o meio homogeneizado através de agitador magnético<sup>2</sup>, por dois minutos. O pH do meio de cultura foi ajustado pela adição de hidróxido de sódio 1N ou ácido acético 5N antes da inoculação e a cada hora, a partir da segunda hora de incubação. O tempo de incubação para produção de beta toxina e épsilon toxina foi de oito e 12 horas, respectivamente. Após esse período, o conteúdo da membrana de diálise foi centrifugado sob refrigeração (4°C) a 12.000 × g, por 30 minutos e o sobrenadante foi filtrado em millipore com membrana de 0,45 e 0,22 µm de porosidade, sob pressão positiva de 80 psi<sup>3</sup>, ajustado o pH e armazenada a 4°C.

A produção de toxinas nos meios CMM, RCM, Jansen, Tarozzi e Pal, consistiu de transferência do inóculo diretamente para o meio de cultura e incubação em jarra de anaerobiose, de acordo com metodologia proposta por Jansen (1961) e Pal et al. (1990). Após o período de incubação, a cultura líquida foi centrifugada, filtrada e armazenada como descrito anteriormente.

A concentração de toxinas foi realizada pela adição de sulfato de amônio (Jansen, 1961) e pela diálise contra polietilenoglicol – PEG<sup>4</sup> 6000 (Al Saadi, 1977; Estrada et al., 1989). No primeiro método, adicionou-se 35 g de sulfato de amônio para cada 100 mL de filtrado e homogeneizado lentamente por agitação magnética durante 30 minutos e mantido em repouso a 4°C por 18

---

<sup>1</sup> White & Martins Ltda

<sup>2</sup> Fisher Thermix Stirrer. Mod 620 M

<sup>3</sup> Precision Scientific, Inc.

<sup>4</sup> Sigma Chemical Company

horas. O precipitado foi separado por centrifugação ( $12000 \times g$ ), sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Ao sobrenadante, foi adicionado mais 2,5 g de sulfato de amônio para cada 100 mL, até que nenhum precipitado fosse formado. As frações precipitadas foram dialisadas contra água destilada estéril por 24-48 horas para eliminação do sulfato de amônio residual. No segundo método, o filtrado foi acondicionado em membrana de diálise e submerso em solução de PEG a 20 %, que foi mantida sob agitação, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 60 horas. A solução de PEG foi substituída a cada 24 horas. Em seguida, o concentrado foi dialisado contra água destilada por 24-48 horas com substituição da água a cada 12 horas. A protoxina épsilon foi ativada pela adição de tripsina<sup>1</sup> (Habeeb, 1969). Os concentrados obtidos pelos dois métodos foram acondicionados em frascos estéreis e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para testar a inocuidade do PEG, uma dose de 0,5 mL de uma solução a 20 % foi inoculada por via endovenosa em quatro camundongos, que foram observados por 72 horas.

### 3.6.3. Titulação de toxinas

Antes da titulação, foi adicionado 0,1 mL de antitoxina A<sup>2</sup> para cada 0,9 mL de toxina produzida, para neutralização da toxina alfa. A mistura foi mantida em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos. A titulação foi realizada utilizando-se diluições duplas de cada tipo de toxina em solução salina peptonada a 1%, para determinação da dose letal 50% - DL<sub>50</sub> (menor quantidade de toxina que mata 50% dos animais inoculados, em até 72 horas após a inoculação), calculada pelo método descrito por Reed & Muench (1938). Para cada diluição foram inoculados quatro camundongos pesando entre 17 e 22 g, com 0,2 mL por via endovenosa e observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida uma vez e os resultados dos dois testes foram acumulados para efeito de cálculo da DL<sub>50</sub>. Em seguida as toxinas beta e épsilon foram padronizadas, respectivamente, em L+ e L<sub>+10</sub>. A beta toxina foi considerada apropriada quando continha, no mínimo, 25 DL<sub>50</sub> em 1,0 L+ e a épsilon toxina quando continha, no mínimo, 20 DL<sub>50</sub> em 1,0 L<sub>+10</sub> (European Pharmacopoeia, 1993).

### 3.6.2. Dosagem protéica

A dosagem de proteína foi realizada pelo método do biureto<sup>3</sup>, através da mistura de 0,1 mL de cada toxina com 5,0 mL do reagente e leitura em densidade ótica (DO) a 545 nm realizada em espectrofotômetro<sup>4</sup>. As toxinas beta e épsilon

<sup>1</sup> Difco Laboratories Ltda.

<sup>2</sup> Wellcome Diagnostics

<sup>3</sup> Labtest Sistemas Diagnósticos Ltda

<sup>4</sup> CELM - Mod. E - 225 D

foram consideradas satisfatórias quando continham, no mínimo, 1L+ em 0,2 mg de proteína e 1 L+/10 em 0,005 mg de proteína, respectivamente (European Pharmacopoeia, 1993).

#### 3.6.4. Toxinotipia

Para confirmação dos tipos de toxinas produzidas, foi utilizada a metodologia descrita por Batty & Glenn (1947) com modificações, que consistiu na mistura de 1,0 mL de toxina beta ou toxina épsilon em diferentes diluições, com 1,0 mL da antitoxina homóloga contendo 1,0 UI/mL. As misturas foram mantidas em banho-maria, a 37°C, por 30 minutos, antes da inoculação, e em seguida foram administrados 0,2 mL, por via intradérmica em cobaios e 0,2 mL por via endovenosa em quatro camundongos/diluição e os animais observados por um período de 72 horas. Cada cobaio recebeu quatro inoculações em diluições crescentes de cada toxina, no sentido ântero-posterior, na região lateral. Como controle, foram feitas inoculações semelhantes de cada tipo de toxina sem antitoxina homóloga. O tipo de toxina foi determinado pela ausência de reação necrótica na pele dos cobaios e sobrevivência dos camundongos, inoculados com a mistura de toxina e antitoxina homóloga.

#### 3.7. Determinação da dose teste das toxinas

A dose teste de cada toxina foi determinada misturando-se 1,0 mL de antitoxinas beta ou épsilon, contendo 10 e 1,0 UI/mL, respectivamente, com volumes graduados da toxina homóloga padronizada e quantidade de solução salina peptonada suficiente para completar o volume para 2,0 mL. A metodologia utilizada foi a descrita pela European Pharmacopoeia (1993), exceto que o volume final foi de 2,0 mL ao invés de 5,0 mL (Kennedy et al., 1977a), realizado da seguinte maneira:

Volumes de toxinas e antitoxinas utilizados na determinação das doses teste

Antitoxina (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Toxina (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Salina (mL)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9

As misturas foram homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 37°C, por 30 minutos e uma dose de 0,2 mL de cada diluição foi inoculada em quatro camundongos, por via endovenosa. Os animais foram observados por um

período de 72 horas. O procedimento foi realizado duas vezes e os resultados dos testes foram somados para efeito de cálculo, realizado pelo método descrito pôr Reed & Muench (1938).

### 3.8. Provas de controle

#### 3.8.1. Teste de esterilidade

De cada partida foi semeado 1,0 mL da vacina em dez tubos contendo caldo tioglicolato<sup>1</sup>, incubados a 37°C, por um período de sete dias, para crescimento de bactérias e em Soybean-casein digest medium<sup>1</sup>, incubados a 25°C, por um período de 14 dias, para crescimento de fungos (Estados Unidos, 1990a).

#### 3.8.2. Teste de inocuidade

O teste de inocuidade foi realizado através da administração de 0,5 mL de cada vacina em oito camundongos, por via intraperitoneal. Os animais foram observados durante sete dias e as vacinas foram consideradas inócuas quando os animais inoculados não apresentavam reações local ou sistêmica adversas (Estados Unidos, 1990b).

#### 3.8.3. Teste de potência

A potência das vacinas foi avaliada através da vacinação de coelhos e determinação do nível de antitoxinas nos soros dos animais vacinados pela técnica de soro-neutralização em camundongos.

Foram utilizados 96 coelhos, divididos em oito grupos com 12 animais cada. Sete grupos foram imunizados com vacinas comerciais, administradas por via subcutânea, com a dose mínima recomendada pelos fabricantes, com dose de reforço, 21 dias após a primo-vacinação (European Pharmacopoeia, 1993). Para controle, um grupo de coelhos foi vacinado com um toxóide bivalente padrão. Os animais foram sangrados por punção cardíaca, aos 14, 21 e 28 dias após a segunda dose. Após a sangria, retração e retirada do coágulo, os tubos com soro foram centrifugados a  $3000 \times g$ , por 15 minutos e em seguida quantidades iguais do soro de cada animal constituíram um "pool" de soros do grupo. Para

---

<sup>1</sup> E. MERCK - 64271 Darmstadt, Germany.

cada "pool" de soro foi adicionado 1 % de timerosal diluído 1:1000 e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Cada "pool" de soro foi titulado frente a 10 doses teste de cada toxina. As misturas foram preparadas de maneira que contivessem 1,0 mL da toxina com volumes graduados do soro a ser titulado e quantidade suficiente de solução salina peptonada a 1% para completar o volume para 2,0 mL. Como controle dos testes, foram utilizadas misturas semelhantes das toxinas com o soro obtido do grupo vacinado com toxóide padrão, além de misturas das toxinas com as respectivas antitoxinas homólogas padrão. As misturas foram mantidas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos e uma dose de 0,2 mL foi inoculada em quatro camundongos/diluição, por via endovenosa. Cada titulação foi repetida uma vez e o título calculado pelo método descrito pôr Reed & Muench (1938).

#### 3.8.4. Avaliação da resposta humoral em caprinos

Foram utilizadas 40 cabras, divididas em quatro grupos de 10 animais cada. Os animais não apresentavam histórico de vacinação anterior contra *C. perfringens* tipo C e/ou D. A cada grupo foi administrado, por via subcutânea, a dose recomendada pelos fabricantes, isto é, 2,0 mL das vacinas D, E e G e 3,0 mL da vacina F, com reforço quatro semanas após. A coleta de sangue foi realizada antes da vacinação e mensalmente por um período de 12 meses. Após a sangria, os soros dos caprinos foram tratados de maneira semelhante ao dos coelhos, exceto que foram armazenados individualmente.

##### • 3.8.4.1. Teste de soro-proteção

Alíquotas iguais do soro dos caprinos de cada grupo constituíram um "pool" que foram submetidos a uma triagem, através da soro-proteção em camundongos, realizada de maneira que cada dose de 0,2 mL contivesse 0,1 mL da toxina beta com 2,5  $\text{DL}_{50}$  ou toxina épsilon com 5  $\text{DL}_{50}$  e 0,1 mL do soro (Tammemagy & Grant, 1967). Como controle do teste, diluições das toxinas foram preparadas, contendo 2,5 e 5  $\text{DL}_{50}$  em cada 0,2 mL de beta e épsilon toxinas, respectivamente. As misturas toxinas-soros e as toxinas controle foram homogeneizadas, mantidas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos e 0,2 mL foi inoculado, por via endovenosa, em dois camundongos. Os soros que conferiram sobrevida aos camundongos, durante 72 horas, foram submetidos a titulação, frente as doses teste de cada toxina, para determinação do nível de anticorpos séricos.

#### 3.8.4.2. Teste de soro-neutralização

O teste de soro-neutralização foi realizado através da mistura dos soros que conferiram soro-proteção aos camundongos, com 10 doses teste de cada toxina. O nível de teste empregado foi de  $L^+$  e  $L+_{/10}$  para beta toxina e  $L+_{/10}$  e  $L+_{/100}$  para épsilon toxina. As misturas foram preparadas de maneira que contivessem 1,0 mL de beta ou épsilon toxinas com volumes graduados do soro a ser titulado e quantidade suficiente de solução salina peptonada a 1% para completar o volume para 2,0 mL.

#### 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As primeiras produções de toxinas foram realizadas sem controle de pH. Títulos que variaram de  $1,0 \times 10$  a  $1,4 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL de beta toxina e de  $1,0 \times 10$  a  $2,5 \times 10$  DL<sub>50</sub>/mL de épsilon toxina foram obtidos quando os meios CMM, Tarozzi e RCM foram empregados (Tab. 1 e 2). Em função destes resultados preliminares, outros meios de culturas foram utilizados e o pH passou a ser controlado em  $7,2 \pm 0,1$  para produção de beta toxina e  $7,6 \pm 0,1$  para épsilon toxina, ajustados a cada hora, a partir da segunda hora de incubação. Desta maneira, produções de toxinas a partir da amostra tipo C (ATCC 3628), nos meios RCM, Pal, Jansen e Al Saadi modificado apresentaram títulos de  $1,5 \times 10^2$ ,  $8,0 \times 10$ ,  $1,0 \times 10$  e  $1,5 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL de beta toxina, respectivamente.

Da mesma forma, a produção de épsilon toxina, a partir da amostra tipo D (ATCC 3629), passou a ser realizada com controle de pH, obtendo-se títulos de  $6,0 \times 10$  nos meios RCM e Pal e  $3,75 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL de épsilon toxina no meio Al Saadi modificado. Os títulos de beta toxina foram cinco vezes maior quando o pH foi controlado, empregando-se CMM. Quanto à produção de épsilon toxina, não houve diferença de título quando o meio utilizado foi o CMM, contudo quando a produção de toxina foi realizada em RCM com pH controlado, o título obtido foi 2,4 vezes maior que sem controle de pH.

Estes resultados confirmam a influência do controle do pH e do meio de cultura empregados na produção de toxinas por *Clostridium perfringens* e estão de acordo com os obtidos por Pivnick et al. (1964; 1965), Worthington et al. (1973), Al Saadi (1977), Sakurai & Duncan (1979), Pal et al. (1990), que obtiveram os melhores títulos de beta e épsilon toxinas quando o pH do meio de cultura foi controlado. Segundo Pivnick et al. (1964; 1965), o controle do pH do meio de cultura pode afetar a síntese e estabilidade das toxinas.

Os títulos iniciais das toxinas produzidas em RCM por um período de incubação de seis e 12 horas foram semelhantes, entretanto, após a concentração com PEG, os títulos das toxinas produzidas com controle de pH foram mais elevados.

As titulações das toxinas produzidas no meio Al Saadi modificado apresentaram os níveis mais elevados de beta toxina ( $1,07 \times 10^3$  DL<sub>50</sub>/mL) e de épsilon toxina

( $3,89 \times 10^3$  DL<sub>50</sub>/mL), após a concentração com PEG, aumentando cerca de 10 vezes o título inicial. A metodologia demonstrou ser de fácil execução, baixo custo e permitiu obter toxinas com títulos suficientes para realização dos testes de soro-neutralização. A desvantagem apresentada foi a viscosidade do concentrado, porém não interferindo na titulação final, tendo em vista a diluição utilizada. A inocuidade da solução de PEG a 20%, foi comprovada pela sobrevivência dos quatro camundongos inoculados por via endovenosa. A precipitação com sulfato de amônio apresentou títulos de  $8,0 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL de beta toxina e  $5,0 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/mL de épsilon toxina, inferiores aos obtidos com PEG.

TABELA 1 – Titulação de beta toxina produzida por *C. perfringens* tipo C (ATCC 3628), de acordo o meio de cultura, o controle de pH e o período de incubação utilizados

Meio de cultura	Incubação (em h)	Título da toxina (DL <sub>50</sub> /mL)	
		Inicial	Concentrado
CMM	6	$5,0 \times 10$	NR
CMM*	6	$1,0 \times 10$	NR
TAROZZI*	9	$1,0 \times 10$	NR
RCM*	6	$1,4 \times 10^2$	$6,0 \times 10^{2**}$
RCM	6	$1,4 \times 10^2$	$8,0 \times 10^{2**}$
RCM	12	$1,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^{2**}$
AL SAADI	8	$1,5 \times 10^2$	$1,07 \times 10^{3**}$
AL SAADI	8	$1,2 \times 10^2$	$8,0 \times 10^{2***}$
PAL	4	$8,0 \times 10$	$8,0 \times 10^{2**}$
JANSEN	4	$1,0 \times 10$	NR

\* Produção sem controle de pH

\*\*\* Concentrado com sulfato de amônio

\*\* Concentrado com polietilenoglicol

NR = Não realizado

Os níveis de toxinas obtidos neste trabalho foram inferiores aos obtidos por Jansen (1961), Pivnick et al. (1964; 1965); Al Saadi (1977); Kulshrestha (1973); Sakurai & Duncan (1979) e Pal et al. (1990) que trabalharam com toxinas purificadas, a partir da precipitação com sulfato de amônio, produzidas a partir de diferentes amostras de *C. perfringens*. No entanto, os resultados obtidos foram superiores aos títulos obtidos por El Idrissi & Ward (1992) que

trabalharam com toxinas beta e épsilon purificadas, produzidas a partir das mesmas amostras empregadas neste trabalho (*C. perfringens*, ATCC 3628 e 3629), sugerindo que os níveis de toxinas produzidos por estas amostras mantiveram-se estáveis, podendo variar em função de determinadas condições do sistema adotado para a produção das toxinas.

TABELA 2 – Titulação de épsilon toxina produzida por *C. perfringens* tipo D (ATCC 3629), de acordo o meio de cultura, o controle de pH e o período de incubação utilizados

Meio de cultura	Incubação (em horas)	Título da toxina (DL <sub>50</sub> /mL)	
		Inicial	Concentrado
CMM*	6	1,0 × 10	NR
CMM	6	1,0 × 10	NR
TAROZZI*	9	1,0 × 10	NR
RCM*	12	2,5 × 10	2,0 × 10 <sup>2**</sup>
RCM	12	6,0 × 10	8,0 × 10 <sup>2**</sup>
RCM	12	6,0 × 10	5,0 × 10 <sup>2***</sup>
AL SAADI	12	3,75 × 10 <sup>2</sup>	3,89 × 10 <sup>3**</sup>
PALL	4	6,0 × 10	7,5 × 10 <sup>2**</sup>
JANSEN	4	6,0 × 10	NR

\* Produção sem controle de pH

\*\* Concentrado com polietilenoglicol

\*\*\* Concentrado com sulfato de amônio

NR = Não realizado

Os resultados do controle de pH durante a produção de toxinas estão demonstrados nas Fig. 1 e 2. Observou-se que a partir da segunda hora de incubação já houve uma variação do pH do meio, principalmente entre duas e sete horas de incubação para beta toxina e entre seis e 11 horas para épsilon toxina. Nestes períodos a produção de gases foi intensa, embora não tenha sido identificado o tipo de gás produzido. A produção de gases, como H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> pelo *C. perfringens* contribui para manutenção do ambiente em anaerobiose (Rood & Cole, 1991), mas acidifica o meio, provocando desnaturação de toxinas (Kulshrestha, 1973).

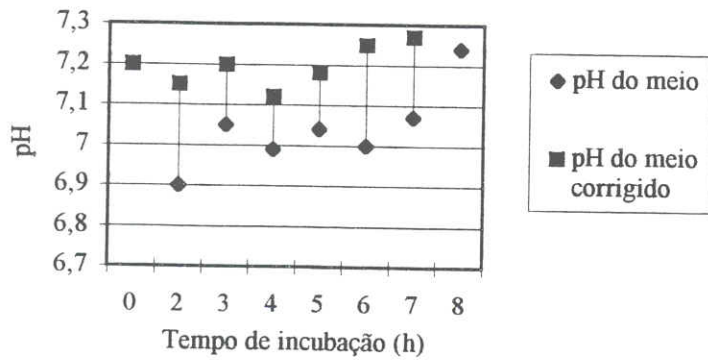


FIGURA 1 - Variação do pH do meio Al Saadi modificado durante produção de beta toxina por *C. perfringens* tipo C (ATCC 3628)

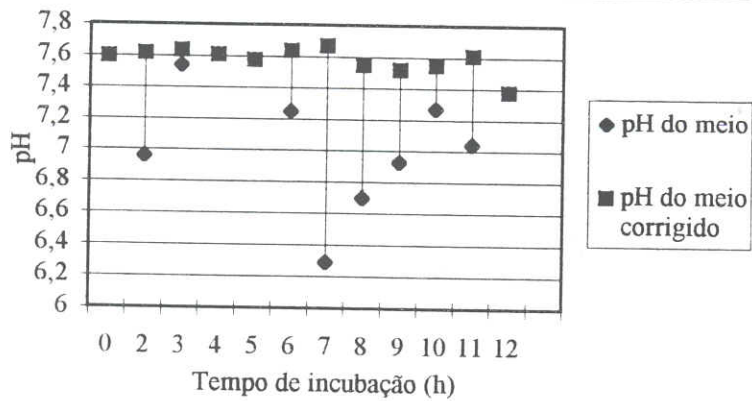


FIGURA 2 - Variação do pH do meio Al Saadi modificado durante produção de épsilon toxina por *C. perfringens* tipo D (ATCC 3629)

Os tipos de toxinas foram confirmados através de reação dermonecrótica em cobaias e inoculação endovenosa em camundongos. A mistura de toxina com antitoxina homóloga não provocou necrose tecidual (Fig. 3 e 4) e/ou morte dos animais inoculados (Tab. 3). Segundo Batty & Glenny (1947) a reação dermonecrótica é específica, principalmente para a épsilon toxina, podendo substituir os testes de neutralização em casos de material em pequena quantidade. Pivnick et al. (1964) demonstraram que beta toxina pode apresentar reação dermonecrótica numa diluição de até 1:20000 e que pode ser neutralizada pelo antisoro C, mas não pelo antisoro B.

As doses testes de beta toxina e épsilon toxina, determinadas ao nível de L+ e L+/10, foram de 40 L+/mL e 125 L+/10 por mililitro, respectivamente. Cada L+ de beta toxina continha 26,79 DL<sub>50</sub> e cada L+/10 de épsilon toxina continha 31,12 DL<sub>50</sub>. Os valores estabelecidos pela European Pharmacopoeia (1993) para se considerar uma toxina apropriada para teste são de que cada L+ de beta toxina contenha 25 DL<sub>50</sub> e cada L+/10 de épsilon toxina contenha 20 DL<sub>50</sub>. Utilizando-se níveis de teste de L+ e L+/10 detecta-se níveis de antitoxinas beta e épsilon de 10 e 1,0 UI/ml, respectivamente, uma vez que a dose teste empregada na titulação dos soros deve ser 10 vezes a dose teste calculada. Testes iniciais dos soros mostraram que os títulos de antitoxinas dos animais imunizados com as vacinas nacionais foram inferiores aos valores mínimos detectáveis com este nível de teste, isto é, foram inferiores a 10 e 1,0 UI/ml, passando-se então ao nível de L+/10 para beta toxina e L+/100 para épsilon toxina, com uma dose teste de 200 L+/10 e 200 L+/100, respectivamente. Pelos resultados apresentados verificou-se que as doses testes das toxinas não foram proporcionais às diluições utilizadas. Níveis de teste podem variar de acordo com a quantidade de anticorpos a serem titulados (Lobato, 1989; Webster & Frank, 1985; Kennedy et al., 1977b).

TABELA 3 — Tipificação das toxinas inoculadas por via intradérmica em cobaias e endovenosa em camundongos

Toxina	Antitoxina	Necrose	Morte*
Beta	alfa	Presente	+
Beta	beta + alfa	Ausente	-
Épsilon	alfa	Presente	+
Épsilon	épsilon + alfa	Ausente	-

\* (+) Os animais morreram, 24 horas após a inoculação

\* (-) Os animais sobreviveram por 72 horas após a inoculação

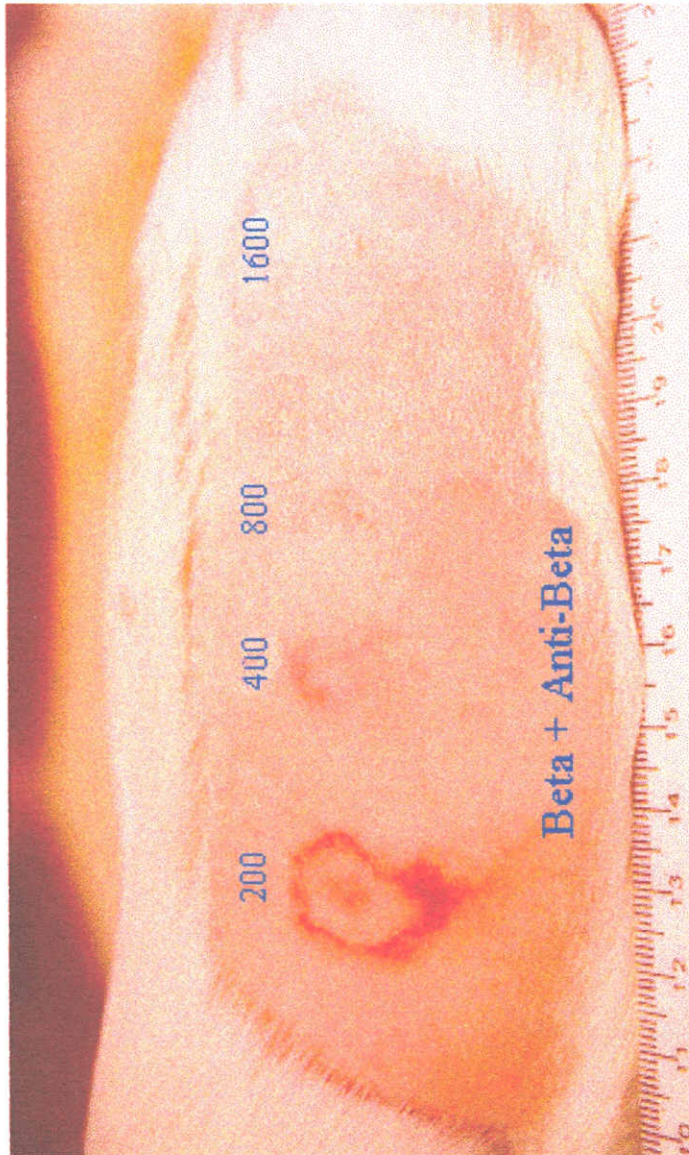


FIGURA 3 - Reação intradérmica em cobaio, 48 horas após a inoculação de beta toxina em diferentes diluições, associadas com 1,0 UI de antitoxina beta padrão

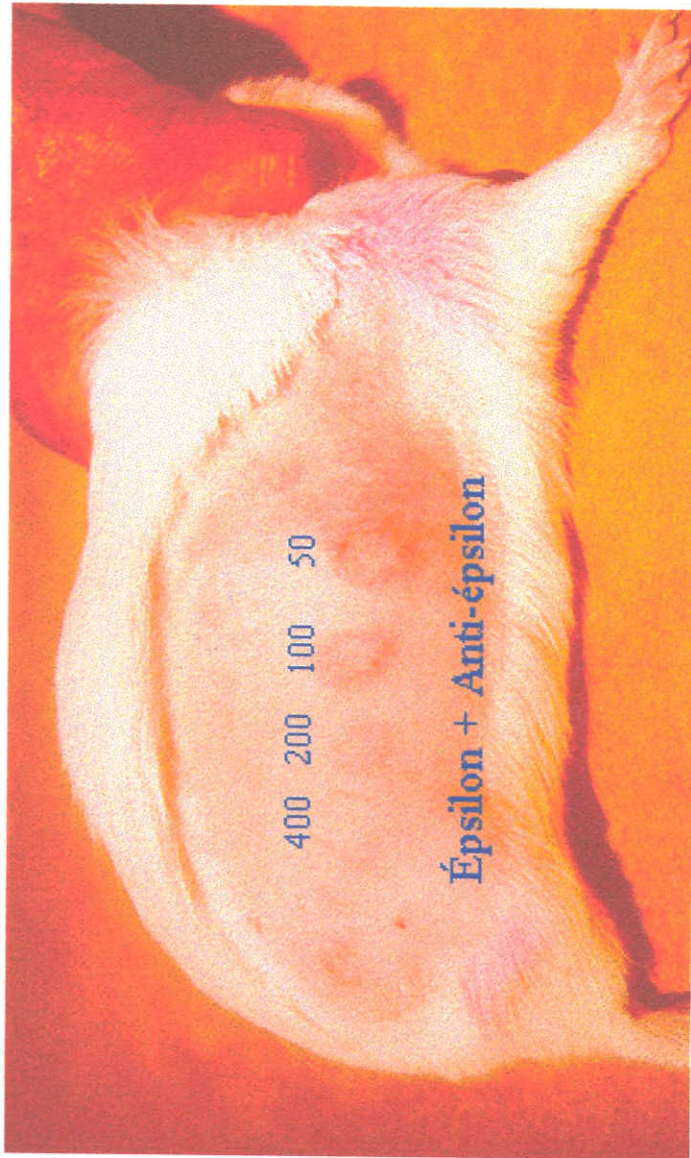


FIGURA 4 - Reação intradérmica em cobaio, 48 horas após a inoculação de épsilon toxina em diferentes diluições associadas com 1,0 UI de antitoxina épsilon padrão

Todas as vacinas apresentaram resultados negativos para crescimento de bactérias e fungos quando cultivados nos meios de culturas utilizados e foram inócuas, por um período de sete dias, quando administradas em camundongos, não apresentando reação local ou sistêmica. Estes resultados corresponderam aos esperados, uma vez que todas as partidas de vacinas de origem nacional são submetidas à controle oficial de esterilidade e inocuidade, realizado no LARA-POA, como parte integrante do controle de qualidade das vacinas contra *C. chauvoei*. Entretanto, os coelhos vacinados apresentaram reação no local de inoculação das vacinas, caracterizadas por acúmulo de material de coloração branco-amarelada, inodoro, circunscrito ao local de inoculação e que desapareceram por volta de 60 dias após a vacinação. Esta reação, provavelmente deveu-se ao adjuvante adicionado às vacinas e foi considerada normal, uma vez que os animais não apresentaram outros sinais.

Os resultados dos testes de potência dos imunógenos comerciais e do toxóide padrão empregados como controle, são apresentados nas Tab. 4 e nas Fig. 5 e 6. O grupo de animais inoculados com a vacina A, apresentou títulos sorológicos de 11, 13 e 13 UI/mL de antitoxina beta e 6, 6,5 e 9 UI/mL de antitoxina épsilon aos 14, 21 e 28 dias, respectivamente, após a aplicação da dose de reforço. Os seis grupos vacinados com as vacinas B, C, D, E, F e G não apresentaram níveis de antitoxinas séricas detectáveis com a dose teste das toxinas beta e épsilon recomendadas, como pode ser visto na Tab. 4.

Do grupo vacinado com o toxóide padrão foram obtidos títulos sorológicos de 20, 27 e 30 UI/mL para antitoxina beta e títulos de 9, 10 e 15 UI/mL para antitoxina épsilon, aos 14, 21 e 28 dias, respectivamente, após a vacinação (Tab. 4).

Em todos os ensaios o controle do teste frente às antitoxinas homólogas padrões, apresentaram resultados de 10 UI/mL e 5 UI/mL para os tipos beta e épsilon, respectivamente. Estes resultados validam as doses testes empregadas. Os níveis de antitoxinas beta e épsilon exigidos no teste de eficiência de vacinas contra *Clostridium perfringens* são de 10 UI/mL para o tipo C e 5 UI/mL para o tipo D, havendo concordância quanto a estes níveis entre British Veterinary Codex (1970), Estados Unidos (1990c) e European Pharmacopoeia (1993).

TABELA 4 – Níveis de antitoxinas beta e épsilon em “pool” de soros de coelhos, coletados aos 14, 21 e 28 dias após a vacinação, com vacinas polivalentes contendo *C. perfringens* tipos C e/ou D, ao nível de L+ para beta toxina e L+<sub>10</sub> para épsilon toxina.

Vacina	Título de beta antitoxina (UI/mL)			Título de épsilon antitoxina (UI/mL)		
	14 dias	21 dias	28 dias	14 dias	21 dias	28 dias
A	11	13	13	6	6,5	9
B	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Toxóide	20	27	30	9	10	15

\* ND = Níveis de antitoxinas não detectáveis com a dose teste utilizada

Os produtos testados, comercializados no país, foram ineficientes em induzir níveis de anticorpos compatíveis com os exigidos no teste, demonstrando a baixa imunogenicidade dos toxóides. Somente a vacina A, de origem internacional e o toxóide padrão induziram níveis de antitoxinas superiores aos exigidos no teste. Os títulos de antitoxinas obtidos, 14 dias após a vacinação, confirmaram o esquema de vacinação recomendado pela European Pharmacopoeia (1993) que estabelece apenas uma coleta de soro, 10 a 14 dias após a segunda dose, para realização dos testes de potência (Fig. 5 e 6).

Foi verificado que o título de beta antitoxina induzido pela vacina A, não aumentou significativamente nos três períodos de coletas considerados, no entanto, o título de épsilon antitoxina aumentou 50 % comparando-se a terceira coleta com a primeira, embora os títulos aos 14 dias tenham sido suficientes para considerar a vacina eficiente. Dholakia et al. (1980) vacinaram coelhos com vacina comercial e obtiveram títulos de antitoxina épsilon de 1,0 e 4,0 UI/ml, 10 e 34 dias após a segunda dose, respectivamente. Sterne et al. (1962) obtiveram em ovinos, títulos de antitoxina beta seis vezes maiores duas semanas após a segunda dose, em comparação com os títulos obtidos duas semanas após a primeira dose, enquanto que os títulos de antitoxina épsilon foram praticamente os mesmos. Webster & Frank (1985) testaram 16 partidas de uma vacina polivalente comercial contendo *C. perfringens* tipo D e obtiveram, 14 dias após a segunda dose, títulos de antitoxina épsilon superiores ao mínimo

exigido em 15 partidas. No mesmo trabalho, os autores compararam a resposta de coelhos e ovinos, obtendo resultados inferiores a 5 UI/mL em apenas uma partida, nas duas espécies.

O emprego de toxóide bivalente padrão foi uma alternativa adotada para o controle das respostas induzidas pelas vacinas comerciais, funcionando também como controle das toxinas e antitoxinas padrões utilizadas na realização dos testes. Os coelhos mostraram-se eficientes como modelo a ser empregado para estimar a potência de vacinas contra *C. perfringens* tipo C e D, em laboratório. Isto foi observado pela disparidade dos resultados entre os grupos de animais imunizados com vacinas de origem nacional e importada e com o toxóide padrão, demonstrando que quando a vacina apresentou imunogenicidade adequada a resposta dos animais foi satisfatória. Trabalhos têm sido desenvolvidos para investigar a resposta de coelhos, comparando-os com outras espécies. Frerichs & Gray (1975) obtiveram títulos mais altos em coelhos que em ovinos. Kennedy et al., 1977b) conseguiram títulos de 40 a 55 e de 50 a 60 UI de antitoxina beta em coelhos e bovinos, respectivamente.

TABELA 5 - Soroproteção em camundongos inoculados com 2,5 DL<sub>50</sub> de beta toxina e soro de caprinos, coletados em diferentes períodos após a vacinação com vacinas polivalentes contendo *C. perfringens* tipos B e/ou C e D

Vacinas	Períodos de coleta (em semanas)							
	0	4	8	12	16	20-28	32-40	44-52
D	2/2*	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
E	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
F	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
G	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

\* = Número de animais mortos / número de animais inoculados

Das quatro vacinas testadas em caprinos, através da soro-proteção, apenas a vacina E conferiu proteção aos camundongos quando inoculados com 2,5 DL<sub>50</sub> de toxina beta e 5 DL<sub>50</sub> de toxina épsilon, quatro semanas após a vacinação (Tab. 5 e 6). As doses de toxinas utilizadas para o teste foram cerca de duas e quatro vezes menores que as doses teste empregadas na titulação dos soros, através da soro-neutralização em camundongos. Os soros coletados a partir da 12ª semana não apresentaram níveis de anticorpos suficientes para proteger os camundongos.

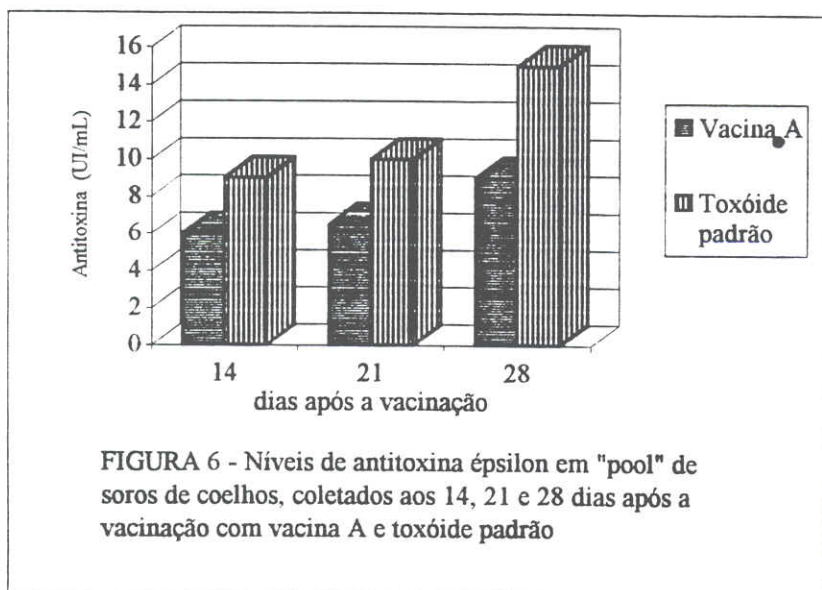
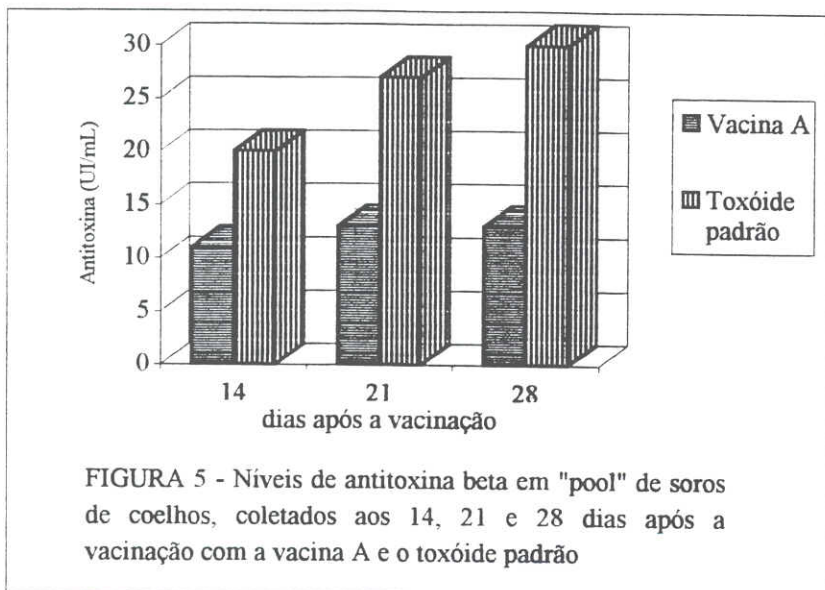


TABELA 6 – Soroproteção em camundongos inoculados com 5 DL<sub>50</sub> de épsilon toxina e soro de caprinos, coletados em diferentes períodos após a vacinação com vacinas polivalentes contendo *C. perfringens* tipos B e/ou C e D

Vacinas	Períodos de coleta (em semanas)							
	0	4	8	12	16	20-28	32-40	44-52
D	2/2*	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
E	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
F	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
G	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

\* = Número de animais mortos / número de animais inoculados

A titulação do "pool" de soros dos caprinos que receberam a vacina E, quando testados frente as doses testes determinadas ao nível de L+ para beta toxina e L<sup>+</sup>/<sub>10</sub> para épsilon toxina, apresentaram resultados inferiores a 10 e 1,0 UI/mL de antitoxinas beta e épsilon, respectivamente, pois todos os camundongos inoculados morreram. Objetivando pesquisar níveis mais baixos de anticorpos, realizou-se novos testes, ao nível de L<sup>+</sup>/<sub>10</sub> para beta toxina e L<sup>+</sup>/<sub>100</sub> para épsilon toxina. Com este nível de teste, títulos de 1,0 UI/mL de antitoxina beta e 0,1 UI/mL de antitoxina épsilon foram determinados, porém de maneira transitória, uma vez que soros coletados a partir da 12<sup>a</sup> semana não apresentaram níveis de anticorpos detectáveis com os níveis de teste empregados (Tab. 7). Estes resultados sugerem que a vacina E, embora tenha protegido os camundongos contra o desafio com uma dose de 2,5 DL<sub>50</sub> de toxina beta e 5 DL<sub>50</sub> de toxina épsilon, foi ineficiente em estimular títulos mais altos de anticorpos.

TABELA 7 – Títulos de antitoxinas beta e épsilon em “pool” de soros de caprinos imunizados com a vacina E, coletados em diferentes períodos

Período após primeira dose (em semanas)	Antitoxina beta (UI/mL)	Antitoxina épsilon (UI/mL)
0	ND*	ND
4	ND	ND
8	1,0	0,1
12 a 32	ND	ND
36 a 52	ND	ND

\* ND = Níveis de antitoxinas não detectáveis com as doses teste de toxinas utilizadas ( $L_{+10}$  para beta e  $L_{+100}$  para épsilon)

Os níveis mais altos de antitoxinas beta (15 - 20 UI/mL) e épsilon (7 - 8 UI/mL) em ovinos foram obtidos por Kennedy et al. (1977a), quando a titulação foi realizada quatro semanas após o reforço, através de soro-neutralização em camundongos. Os mesmos animais apresentaram títulos de 5 - 10 e 3 - 4 UI/mL, seis semanas após a segunda dose. Green et al. (1987) avaliaram a resposta de ovinos e caprinos à vacinação com três toxóides comerciais, através de ELISA, e constataram que não houve diferença significativa na titulação dos níveis de anticorpos entre os ovinos aos 14 e 28 dias, porém, nos caprinos, duas vacinas apresentaram aumento de títulos significativos aos 14 dias, mas os três toxóides apresentaram redução dos títulos, 28 dias após a vacinação, não havendo diferença entre os grupos vacinados e o grupo controle, não vacinado.

Os níveis de antitoxina beta necessários para proteger os animais contra o desafio com toxina beta não são conhecidos. Quanto à antitoxina épsilon, Jansen (1960) determinou que títulos de 0,15 UI/mL de soro protegeram ovinos desafiados com cultura de *C. perfringens* tipo D. Considerando 0,1 UI/mL como valor mínimo protetor, os resultados apresentados indicam que todas as vacinas testadas em caprinos foram ineficientes em estimular resposta imunológica suficiente para proteção dos animais contra o tipo D.

As vacinas polivalentes contra clostrídios comercializadas no Brasil contém de quatro a seis antígenos. No entanto, apenas o *C. chauvoei* é oficialmente testado pelo MAA, para controle de eficiência, ficando os demais antígenos a critério dos laboratórios produtores. A incorporação de novos componentes às vacinas é uma medida desejável, contudo, sua efetividade precisa ser comprovada pelos órgãos oficiais de fiscalização.

Os resultados apresentados foram semelhantes aos obtidos por Lobato (1989), quando avaliou as vacinas antituberculínicas e confirmou a ineficiência daqueles produtos em estimular resposta imunológica adequada nos animais vacinados. Por outro lado, os resultados deste trabalho não configurou nenhuma surpresa, uma vez que, salvo exceções, o pensamento que norteia a estratégia da indústria obedece a uma lógica econômica capitalista perversa, subestimando na maioria das vezes, a questão técnica e ética de oferecer produtos de qualidade ao consumidor final. Com estes resultados, comprova-se, mais uma vez, a má qualidade das vacinas comercializadas no Brasil, indicando a necessidade de se estabelecer uma discussão no sentido de desenvolver métodos eficientes para produção de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo C e/ou D e implementar o controle oficial destes produtos.

## 5. CONCLUSÕES

As vacinas contra clostrídios que contém em sua composição *C. perfringens* tipo C e/ou D, produzidas no Brasil e testadas neste trabalho, mostraram-se estéreis e inócuas, porém quanto à potência, foram ineficientes em estimular níveis sorológicos de beta e épsilon antitoxinas, compatíveis com o teste de soro-neutralização recomendado para controle destes produtos.

A produção de toxinas em membrana de diálise e com controle de pH do meio de cultura mostrou-se como uma alternativa a ser empregada na obtenção de toxinas com títulos mais elevados.

## 6. SUMMARY

Key-words: Goats, Vaccine, Toxin, *Clostridium perfringens*, Enterotoxemia

Seven commercial vaccines against clostridiosis, which had in their composition type C and/or D *Clostridium perfringens* toxoids, have been evaluated for sterility, residual toxicity and potency. Six vaccines were produced in Brazil and one was imported. A bivalent toxoid standard of *C. perfringens* type C and D has been used as a test control. All tested vaccines were sterile when cultivated in bacteria and fungi growth media, and were innocuous when administered to mice via intraperitoneal route. In relation to the potency, evaluated by mice serum neutralization tests using immunized rabbits sera pooled, the imported vaccine and the standard toxoid have presented higher serum antibodies titres than the required minimum level of 10 and 5 IU/mL for beta and epsilon toxins produced from type C and D *C. perfringens*, respectively. The brazilian made vaccines were ineffective in stimulating serum antibodies levels specific to beta and epsilon toxins, according to the recommended test level for quality control. Four out of six brazilian made toxoids were also tested in goats but did not present detectable antitoxins levels within the test level of L+ or L+<sub>10</sub> used for beta and epsilon toxins, respectively. The toxins utilized have been produced cultivating *C. perfringens* within in dialysis membrane.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL SAADI, A.A. Pathogenicity and immunogenicity of *Clostridium perfringens* type C and D. Fort Collins: Colorado State University, 1977. 157 p. Tese (Doutorado).
- BALDASSI, L., CALIL, E.M.B., PORTUGAL, M.A.S.C. et al. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 32, n. 2, p. 109-113, 1995.
- BATTY, I., GLENNY, A.T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxins and antitoxin. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 27, p. 110-126, 1947.
- BLACKWELL, T.E., BUTLER, D.G. Clinical signs, treatment, and postmortem lesions in dairy goats with enterotoxemia: 13 cases (1979 - 1982). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 200, n. 2, p. 214-217, 1992.
- BRITISH VETERINARY CODEX. London: The Pharmaceutical Press, 1970. p. 126-129: *Clostridium welchii* vaccines.
- CAMERON, C.M. Effective immunization of lambs against enterotoxaemia. **Ondestepoort J. Vet. Res.**, v. 47, n. 4, p. 287-289, 1980.
- CÓDIGO ZOOSANITÁRIO INTERNACIONAL. 5. ed. Paris: Office International des Epizooties - OIE, 1986. p. 442-447: *Clostridium perfringens*.
- CORREA, W.M., CORREA, C.N.M., LOPES, C.A.M. et al. Enfermidades por clostrídios. 1969-1978. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v. 32, n. 3, p. 369-374, 1980.
- DEVRIESE, L. A., DAUBE, G., HOMMEZ, J. et al. In vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, n. 1, p. 55 - 57, 1993.

- DHOLAKIA, P.M., SAXENA, S. P., DHAWEDKAR, R.G. Observations on the comparative efficacy of alum precipitated and aluminium hydroxide gel adsorbed toxoids against *Clostridium welchii* type D. **Indian Vet. J.**, v. 57, n. 11, p. 875-878, 1980.
- EL IDRISSE, A.H., WARD, G.E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. **Vet. Microbiol.**, v. 31, n. 1, p. 89-99, 1992.
- EL IDRISSE, A.H., WARD, G.E., JOHNSON, D.W. et al. Bacteriological investigation of sudden sheep mortality in Morocco. **Prev. Vet. Med.**, v. 12, n. 1-2, p. 34 - 46, 1992.
- ESTADOS UNIDOS [Leis, etc]. **Code Federal Regulations**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1990a. p. 425-426: Detection of viable bacteria and fungi except in live vaccine.
- ESTADOS UNIDOS [Leis, etc]. **Code Federal Regulations**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1990b. p. 431-432: Mouse safety tests.
- ESTADOS UNIDOS [Leis, etc]. **Code Federal Regulations**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1990c. p. 454-457: *Clostridium perfringens* type C and D toxoid and bacterin-toxoid.
- ESTRADA, C.A.E., BACA, M.E., TAYLOR, D.J. Studies on the alpha toxin of *Clostridium perfringens* type a in pigs. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 31, p. 45-50, 1989.
- ESTRADA, C.A.E., TAYLOR, D.J. Porcine *Clostridium perfringens* type A spores, enterotoxin and antibody to enterotoxin. **Vet. Rec.**, v. 124, n. 23, p. 606-610, 1989.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1993. p. 363: *Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium*.
- FRERICHS, G.N., GRAY, A.K. The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. **Res. Vet. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 70-75, 1975.

- FUJITA, M., MORITA, Y., SHIMODA, M. et al. Prevalence of intestinal zoonotic bacteria and parasites in the faeces of dogs. **J. Jap. Vet. Med. Assoc.**, v.47, n.2, p. 141 - 145, 1994.
- GREEN, D.S., GREEN, M.J., HILLYER, M.H. et al. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. **Vet. Rec.**, v. 120, n. 2, p. 435-439, 1987.
- GRIESEMER, R. A., KRILL, W. R. Enterotoxemia in beef calves - 30 years observation. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 140, n. 2, p. 154 - 158, 1962.
- HABEEB, A. F. S. A. Studies on  $\epsilon$ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. I. Purification methods: Evidence for multiple forms of  $\epsilon$ -prototoxin. **J. Biochem. Biophys.**, v. 130, p. 430-440, 1969.
- JANSEN, B.C. The beta toxin of *Clostridium welchii* type B, Wildson, in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. **Onderstepoort. J. Vet. Res.**, v. 28, n. 4, p. 495-549, 1961.
- JANSEN, B.C. The diagnosis of pulpy kidney disease. **J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 31, p. 15-20, 1960.
- JANSEN, B.C. The production of a basic immunity against pulpy kidney disease. **Onderstepoort. J. Vet. Res.**, v. 34, n 1, p. 65-80, 1967.
- KEAST, J. C., McBARRON, E. J. A cause of bovine enterotoxemia. **Aust. Vet. J.**, v. 30, n. 10, p. 305 - 306, 1954.
- KENNEDY, K.K., NORRIS, S.J., BECKENHAUER, W.H. et al. Antitoxin response in cattle vaccinated with *Clostridium perfringens* type C toxoid. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, v. 72, n. 7, p. 1213-1215, 1977a.
- KENNEDY, K.K., NORRIS, S.J., BECKENHAUER, W.H. et al. Vaccination of Cattle and Sheep with a Combined *Clostridium perfringens* Types C and D Toxoid. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, n. 10, p. 1515-1517, 1977b.
- KERRY, J.B., CRAIG, G.R. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. **Vet. Rec.**, v. 105, n. 15, p. 551-554, 1979.
- KNOTT, G.K.L., ERWIN, B.G., CLASSICK, L.G. Benefits of a clostridial vaccination program in feedlot cattle. **Vet. Med.**, v. 80, n. 6, p. 95-98, 1985.
- KULSHRESTHA, S.B. Effect of period of incubation and pH on the production of beta and epsilon toxins by *Cl welchii* types B and C. **Ind. J. Anim. Sci.**, v. 43, n. 11, p. 987-990, 1973.

- KUMAR, A.A.; UPPAL, P.K., KATARIA, J.J. Studies on enterotoxaemic vaccination in goats and their humoral response. **Indian Vet. J.**, v. 69, n. 9, p. 778-781, 1992
- LOBATO, F.C.F. **Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1989. 59 P. Dissertação (Mestrado).
- NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. **Can. Vet. J.**, v. 21, n. 5, p. 141-148, 1980.
- PAL, K. K., HARBOLA, P. C., SIKDAR, A. et al. Different physico-chemical factors on the beta toxin production of *Clostridium perfringens* type B. **Ind. J. Anim. Sci.**, v. 60, n. 4, p. 424-425, 1990
- PIVNICK, H., HABEEB, A. F. S. A., GORENSTEIN, B. et al. Effect of pH on toxinogenesis by *Clostridium perfringens* type C. **Can. J. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 329-344, 1964.
- PIVNICK, H., HAUSCHILD, A. H. W., GORENSTEIN, B. et al. Effect of controlled pH on toxinogenesis by *Clostridium perfringens* type D. **Can. J. Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 45-55, 1965.
- REED, L.J., MUENCH, H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- ROOD, J.I., COLE, S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n. 4, p. 621-648, 1991.
- SAKURAI, J., DUNCAN, C.L. Effect of carbohydrates and control of culture pH on beta toxin production by *Clostridium perfringens* type C. **Microbiol. Immun.**, v. 23, n. 5, p. 313-318, 1979.
- SAKURAI, J., DUNCAN, C.L. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. **Infect. Immun.**, v. 18, n. 3, p. 741-745, 1977.
- SAKURAI, J., FUJII, Y. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxina. **Toxicology**, v. 25, n. 12, p. 1301-1310, 1987

- SEIFERT, H.S.H., BÖHNEL, H., RANAIVOSON, A. Prophylaxis of anaerobic infections of ruminants in Madagascar by the intradermal application of ultrafiltered toxoids from local strains of clostridia. **Anim. Res. Dev.**, v. 19, p. 67-82, 1984.
- SILVEIRA, D., SOUZA, A.M., MESQUITA, A.J., et al. Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância emergente. **Bol. tec. Inf. Rhodia-Mérieux**, v 2, n. 3, p. 1-4, 1995.
- STERNE M. Clostridial infections. **Br. Vet. J.**, v. 137, n. 5, p.443-454, 1981.
- STERNE, M., BATTY, I., THOMSON, A. et al. Immunisation of Sheep with Multi-component Clostridial Vaccines. **Vet. Rec.**, v. 74, n. 34, p. 909-913, 1962.
- STERNE, M., WARRACK, G.H. The types of *Clostridium perfringens*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 88, n. 1, p. 279-283, 1964.
- TAMMEMAGY, L., GRANT, K.M. Vaccination in the control bovine botulism in Wuesland. **Aust. Vet. J.**, v. 43. n. 9. p. 368-373. 1967.
- TENGERDY, R.P., MEYER, D.L., LAUERMAN, L.H. et al. Vitamin E-enhanced humoral antibody response to *Clostridium perfringens* type D in sheep. **Brit. Vet. J.**, v. 139, n. 147, p. 147-151, 1983.
- UZAL, F.A., PASINI, M.I., OLAECHEA, F.V. et al. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. **Vet. Rec.**, v. 135, n. 17, p. 279-280, 1994.
- 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. **Aust. Vet. J.**, v. 62, n. 4, p. 112-114, 1985.
- WORTHINGTON, R.W., MÜLDERS, M.S.G., VAN RENSBURG, J.J. *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin. Some chemical, immunological and biological properties of a highly purified prototoxin. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 40, n. 4, p. 145-152, 1973.