

Gláucia Mansur Balsamão

T636.089 69

B1962

2001

**TESTE DE POTÊNCIA PARA *CLOSTRIDIUM SORDELLII* EM VACINAS
COMERCIAIS CONTRA CLOSTRIDIOSES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato.

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

01/04/02

449702-03

0328 - 58260

B196t Balsamão, Gláucia Mansur, 1974-
2001 Teste de potência para *Clostridium sordellii* em vacinas comerciais contra clostridioses / Gláucia Mansur Balsamão. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2001.
25p.: il.
Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
1. Bovino - Doenças -- Teses. 2. Clostridiose -- Vacina - Teses. 3. Vacinas veterinárias -- Teses. I. Título.

CDD - 636.208 96

Dissertação defendida e aprovada em 09 de Julho de 2001, pela Comissão examinadora constituída por:



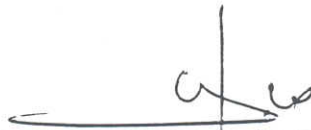
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Orientador



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Profa. Zélia Inês Portela Lobato



Prof. Nivaldo da Silva

*Aos meus amados pais
Wanderlei e Terezinha*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Carlos Faria Lobato pela amizade, aprendizagem, força, inesgotável incentivo e paciência além da admirável orientação ao longo do curso;

Ao Prof. Nivaldo da Silva pela orientação em meu trabalho e seus conselhos que contribuíram na minha carreira profissional;

À Profa. Vera Viegas pela disposição em ensinar e auxílio na elaboração desse trabalho;

Ao Dr. João Maia e Dr. Ricardo Aurélio pela amizade, incentivo, alegria e contribuição com suas idéias geniais na realização desse trabalho;

Aos Profs. Andrey Pereira Lage, Rômulo Cerqueira Leite e Romário Cerqueira Leite pela orientação em meu trabalho e seus conselhos que contribuíram na minha carreira profissional;

Ao Cid, Ana Paula, Nelson, Josely e José Renato pela grande amizade, incentivo, alegria e energia na realização desse trabalho;

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos Ronny, Lili e Patrícia que influenciaram com conselhos, alegria e idéias este projeto e em minha vida;

À Patrícia e Maurício Peixer pela incomensurável amizade, força e carinho nesta etapa da minha vida.

À minha família que eu amo tanto, minha irmã Letícia, meus irmãos Gustavo e Flávio, minha cunhada Luciana e a meus pais Wanderlei e Terezinha, por serem minha vida, minha alegria e meus exemplos. A vocês agradeço por tudo que sou.

Ao Laboratório Regional de Apoio Animal em Pedro Leopoldo, através do Dr. Pedro Mota, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária – FEP-MVZ Coordenação Preventiva pelo apoio financeiro.

A todos estes maravilhosos amigos, meus sinceros e profundos agradecimentos!

“Deus cria. As pessoas reorganizam.”

Joseph Casey

SUMÁRIO		Pág.
	RESUMO	13
	ABSTRACT	13
1.	INTRODUÇÃO	15
2.	LITERATURA CONSULTADA	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Local da Realização do Trabalho	17
3.2	Animais	17
3.3	Vacinas	18
3.4	Meios de cultura	18
3.5	Amostra padrão de <i>Clostridium sordellii</i> para produção da suspensão de esporos	18
3.5.1	Cultivo da amostra padrão	18
3.5.2	Manutenção da amostra padrão	18
3.5.3	Método para produção de esporos	19
3.5.3.1	Preparação do meio de Kolbe	19
3.5.3.2	Cultivo de suspensão bacteriana	19
3.5.3.3	Coleta da suspensão bacteriana	19
3.6	Prova de Pureza	19
3.7	Provas de Potência	19
3.7.1	Titulação da suspensão de esporos	19
3.8	Manutenção da suspensão de esporos	20
3.9	Controle da eficiência	20
3.9.1	Delineamento da prova	20
3.9.2	Esquema de vacinação e desafio	20
3.9.3	Normas de interpretação da prova	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.	CONCLUSÃO	23
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Título em DL ₅₀ das três repetições da suspensão de esporos de <i>Clostridium sordellii</i> , antes e após armazenamento por 12 meses a -70°C, em cobaias inoculadas por via intramuscular (IM).	21
Tabela 2 -Comparativo de resultados obtidos nas titulações da suspensão de esporos realizadas no intervalo de 12 meses.	21
Tabela 3 - Resultado do teste de potência das vacinas comerciais contendo em sua composição <i>Clostridium sordellii</i> , em 2000.....	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Codificação das vacinas contra clostridiose e seus respectivos laboratórios, comercializadas no Brasil e avaliadas quanto à eficiência, em 2000.	18
--	----

RESUMO

Foram avaliadas quanto à eficiência, doze vacinas comerciais contra clostridioses e uma vacina padrão, que continham em sua composição *Clostridium sordellii*. Foi utilizado o método de desafio em cobaios imunizados com 1/5 dose bovina, com 100 DL₅₀ de uma suspensão de esporos com 5% de CaCl₂. Das 13 vacinas testadas, apenas a vacina padrão e três vacinas comerciais atenderam aos requisitos mínimos. Duas vacinas, codificadas "T₆" e "T₈" apresentaram resultados igual à vacina padrão, protegendo todos os animais desafiados. A vacina codificada "T₁₀" não atendeu os requisitos mínimos exigidos no primeiro teste. Entretanto, no reteste, o acumulado de animais não foi superior a quatro óbitos sendo considerada eficiente. Todas as vacinas foram consideradas estéreis e inócuas.

Palavras-chave: Clostridioses, Bacterina, vacina, *Clostridium sordellii*, bovino.

ABSTRACT

Twelve commercial vaccines used in Brazil which contain *Clostridium sordellii* have been compared with a standard vaccine, produced in United States of America. A method was used to estimate the protection of guinea pigs which were immunized with 1/5 of the dose used in bovines containing 100LD₅₀ of spores in 5% of CaCl₂. All tested vaccines were sterile and didn't induce disease. As far as efficacy is concerned, from those 13 tested vaccine, only the standard vaccine and three commercial vaccines reached the required quality. Two vaccine labelled "T₆" and "T₈" gave identical results as the standard vaccine protecting all the challenged animals. The vaccine labelled "T₁₀" after being re-tested was considered efficient.

Key words: Clostridiosis, bacterin, vaccine, *Clostridium sordellii*, cattle.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* está amplamente distribuído na natureza. A maioria das espécies deste gênero é constituinte da microbiota intestinal, porém, poucas, aproximadamente quatorze, são capazes de produzir enfermidades nos animais, muitas destas em explorações bovinas e ovinas.

O *Clostridium sordellii* está mais associado ao edema maligno dos bovinos, mas existem relatos da participação deste agente em quadros de enterite hemorrágica (Smith *et al.*, 1962), enterotoxemia (Richard e Hunt, 1982), enterotoxemia hemorrágica e necrosante (Al Mashat e Taylor, 1983), infecção neonatal (Popoff, 1984), enterite, enterotoxemia, morte súbita em ovinos (Lewis e Naylor, 1998).

As enfermidades causadas por microrganismos do gênero *Clostridium* levam a perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento na grande maioria dos casos é impraticável.

Os prejuízos econômicos advindos desta enfermidade são difíceis de serem avaliados, pois faltam dados epidemiológicos para isto. Porém esses são bastante elevados uma vez que a evolução da doença é rápida, o que dificulta qualquer ação terapêutica. O processo pode, entretanto, ser prevenido através da imunização dos animais.

Devido às modificações ocorridas nos sistemas criatórios do país, levando ao surgimento de novas enfermidades e recrudescimento de outras, houve um aumento significativo na produção de imunobiológicos. No Brasil, em 2000, foram produzidas 129.969.577 doses de vacinas contra clostridioses, sendo que, aproximadamente, 78 milhões foram de vacinas com múltiplos antígenos (BRASIL, 2001). São 16 laboratórios produzindo 39 vacinas polivalentes contra clostridiose sendo que 11 destes laboratórios produzem e comercializam 12 vacinas que contêm em sua composição *Clostridium sordellii*. Diante de uma produção significativa de doses vacinais faz-se necessário um controle oficial destas visando uma melhor qualidade na produção de imunobiológicos para garantir resultados satisfatórios.

Apesar de existir uma portaria para o controle oficial de todos os antígenos das vacinas clostridiais (Brasil, 1997), apenas *Clostridium chauvoei* e toxóide botulínico são controlados oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nos Laboratórios de Apoio Animal em Porto Alegre (LARA/POA) e em Pedro Leopoldo (LARA/PL), respectivamente.

Além disso, o estabelecimento do 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, entre os quais as vacinas, sobretudo em função do acelerado intercâmbio de animais, que poderá ocorrer entre esses países e, conseqüentemente, maior transmissão de doenças. Diante disso, faz-se necessário a introdução e padronização de um teste para os antígenos presentes nas vacinas, dentre eles, o *Clostridium sordellii*, que são comercializadas sem controle oficial.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficácia de vacinas comercializadas no Brasil com múltiplos antígenos clostridiais, de diferentes laboratórios, que continham em sua composição *Clostridium sordellii*.

2. LITERATURA CONSULTADA

Muitos processos infecciosos que afetam as explorações bovinas e ovinas são determinados por bactérias do gênero *Clostridium*. A prevalência das cerca de 100 espécies varia geograficamente. A maioria é constituinte da microbiota intestinal, porém, poucas, aproximadamente quatorze, são capazes de produzir enfermidade nos animais (Smith, 1975).

Segundo Sneath *et al.* (1986), este microrganismo se insere na sistemática como sendo: Schizomycetes, ordem Eubacteriales, família Bacillaceae, gênero *Clostridium*, espécie *sordellii*. Popoff (1984) sugere que existam pelo menos, 43 amostras diferentes de *Clostridium sordellii*, que são bactérias anaeróbicas esporuladas, produtoras de toxinas essencialmente proteicas. O *Clostridium sordellii* produz duas toxinas, toxina hemorrágica (HT) e toxina letal (LT). São lecitinase, gelatinase,

glucose, urease e indol positivos, lipase e lactose negativos (Holdeman et al., 1977).

Em 1922, Sordelli isolou pela primeira vez um clostrídeo altamente toxigênico nomeado de *Bacillus oedematis sporogenes*, isolado de um caso de gangrena gasosa em humanos (Sordelli, 1922). Em 1927, o organismo foi novamente isolado e renomeado *Bacillus sordellii*. Mais tarde foi incluído no gênero *Clostridium* por ser considerado uma variante toxigênica do *Clostridium bif fermentans*. (Clark e Hall, 1927; Tattaki e Muet, 1953).

Brookes et al. (1956) descreveram, na Inglaterra, o primeiro caso de morte súbita em uma novilha com o isolamento de *Clostridium sordellii*.

Na Austrália, *Clostridium sordellii* foi considerado um dos agentes responsáveis pelo edema maligno (Beveridge, 1983, Lewis e Naylor, 1998). Na Inglaterra Richards e Hunt (1982), descreveram casos de morte súbita em cordeiros de quatro a 10 semanas e confirmaram o diagnóstico pelo isolamento de *Clostridium sordellii* no fígado.

Al Mashat e Taylor (1983) relataram o isolamento de *Clostridium sordellii* de carcaças de cordeiros nas quais não apresentaram alterações patológicas descritas compatíveis com *Clostridium sordellii* e relataram um caso de enterite fatal em uma ovelha onde o mesmo agente foi isolado, sendo portanto o possível patógeno responsável.

Abu-Sanra et al. (1984) isolaram *Clostridium sordellii* do fígado de ovino. Eles concluíram que a presença do *Clostridium sordellii* agravou e complicou o quadro de hepatite infecciosa ocasionada pelo *Clostridium novyi* tipo B.

Vários relatos feitos na Europa identificaram *Clostridium sordellii* como um dos principais causadores de morte súbita em ovinos (El Idrissi et al., 1992). Popoff (1984) investigou uma série de mortes súbitas em ovinos no sul da França e isolou *Clostridium sordellii* de 12 animais dos 19 que foram examinados. Entretanto, em outros casos de clostridioses, é isolado *Clostridium perfringens* são isolados.

El - Idriss et al. (1992) isolaram *Clostridium sordellii* em associação a *Clostridium*

perfringens de 14 amostras, de 128 casos de morte súbita em ovinos no Marrocos.

Nos Estados Unidos, Smith et al. (1962) descreveram casos de enterite hemorrágica associado ao *Clostridium sordellii*, mas estes agentes foram isolados apenas do intestino.

Na América do Sul, *Clostridium sordellii* foi isolado de casos severos de morte súbita em ovinos na Terra do Fogo, Monteverde e Congliaro-de-Fernandez (1976) isolaram organismos da maioria dos tecidos, incluindo, fígado, baço, intestino e sangue e nenhum outro microrganismo não-patogênico foi isolado.

Amado (1990), em Portugal, isolou *Clostridium* spp em 43 dos 53 casos de ovinos com suspeita de clostridiose, sendo que em quatro amostras o agente isolado foi *Clostridium sordellii*.

Richard & Hunt (1982), descreveram perdas de ovinos de idades variando de quatro a 10 semanas. As maiores alterações ocorreram no fígado. *Clostridium sordellii* foi isolado e considerado responsável por estas mortes na Inglaterra. Lewis & Naylor (1998) isolaram *Clostridium sordellii* de 37 ovinos mortos subitamente. Os animais variavam na idade mas as lesões mais severas eram encontradas em cordeiros de quatro a 10 semanas. Nos animais mais velhos as lesões eram mais brandas. Outros 30 animais apresentando sintomatologia semelhante foram analisados e não foi isolado o *Clostridium sordellii*. Isto evidenciou que esta bactéria provavelmente seria responsável por morte súbita em ovinos na Inglaterra.

Nos últimos anos, houve uma crescente modificação nos sistemas de criação, que se tornaram cada vez mais intensivos. A alta concentração de animais implica em se ter uma proteção em massa frente a uma série de enfermidades, que passaram a ser comuns com as novas técnicas de manejo implantadas. A tendência atual é a utilização de vacinas com múltiplos antígenos contra várias enfermidades em única ocasião. Esta prática visa minimizar os problemas de estresse e manejo, assim como evitar reações tipo anafiláticas à inoculação de produtos tóxicos, inflamações locais, traumas de inoculação, reações aos adjuvantes, dor e febre entre outros (Horsch, 1984; Pinochet & Abalos, 1989; Pinochet et al., 1992).

No Brasil, são produzidos imunógenos em grande escala, porém sem controle efetivo de órgãos oficiais. Isto é demonstrado em trabalhos realizados por pesquisadores, com vacinas clostridiais. Lobato (1989), ao avaliar as vacinas antitoxulínicas comercializadas no Brasil, constatou que nenhum dos produtos testados foi eficiente para estimular resposta imunológica adequada nos animais vacinados. Azevedo *et al.* (1998) ao avaliarem a eficiência de toxóides contra *Clostridium perfringens* tipo C e D comercializados no país, constataram que nenhum dos produtos testados apresentaram níveis mínimos de anticorpos neutralizantes nos animais imunizados. Lobato *et al.* (2000) ao avaliarem seis toxóides de *Clostridium perfringens* tipo C e D comercializados no Brasil, constataram que apenas dois foram capazes de induzir níveis de anticorpos compatíveis com os exigidos no teste de potência.

As enfermidades causadas por microrganismos do gênero *Clostridium* podem levar à perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento, na grande maioria dos casos, é impraticável, sendo o prognóstico desfavorável. Devido as características ecológicas destes agentes que, são ubiqüitários do trato digestivo dos animais e do solo, resistindo na natureza na forma de esporos, a erradicação destas enfermidades é praticamente impossível. Entretanto, o controle é possível pela implementação de programas baseados em medidas adequadas de manejo e principalmente na utilização de vacinas em todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades (Lobato e Assis, 2000).

Os componentes clostridiais presentes nas vacinas polivalentes protegem contra uma alta produção de toxinas por estes agentes em casos de infecção em ovinos. Isto contribui na redução de perdas por mortes em rebanhos ovinos vacinados (West, 1993). Em testes de potência de vacinas contra alguns clostrídios, utiliza-se substâncias capazes de gerar lesão tecidual favorecendo, desta maneira, a colonização pelo agente. A utilização de CaCl_2 como uma destas substâncias capazes de causar lesões teciduais, pode ser descrita em vários trabalhos com variações nas concentrações utilizadas. Apesar

de Macheak *et al.* (1972) terem utilizado, na prova de desafio, CaCl_2 na concentração final de 2,5%; a concentração de 5% utilizada por Neves (1997) demonstrou que, nesta concentração, os resultados obtidos eram mais uniformes.

A eficiência das vacinas clostridiais relaciona-se à natureza dos antígenos que as compõem, sendo estes toxóides e/ou bacterinas. São de natureza altamente antigênica, quando bem elaboradas podendo oferecer boa proteção aos animais. As vacinas comercializadas no país são combinadas ou compostas por múltiplos antígenos e são usadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e ou produtos tóxicos que podem estar participando das enfermidades. Em razão da patogenia de cada agente envolvido nos quadros de clostridioses, as vacinas devem conter em sua composição bacterina, toxóides ou bacterinas/toxóides. (Lobato & Assis, 2000).

Aliado aos fatores relacionados à produção de toxóides e bacterinas, um outro aspecto importante é o controle de qualidade dos imunógenos produzidos. Em diversos países da União Européia e nos Estados Unidos, a produção e controle de qualidade das vacinas são regidos pelo "codex" nacional de produção e controle (Estados Unidos, 1996, Farmacopéia Européia, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da realização do trabalho

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Pedro Leopoldo (LARA/PL/MAA) no Estado de Minas Gerais.

3.2 Animais

Foram utilizadas cobaias albinas da linhagem "English short ear", ambos os sexos, com peso entre 300 e 500g (Macheak, 1976, *apud* Neves, 1997), oriundos do Biotério do Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Porto Alegre - Rio Grande do Sul (LARA/POA).

3.3 Vacinas

Foram adquiridas ao acaso, no comércio, 12 vacinas com múltiplos antígenos clostridiais de 11 diferentes laboratórios, que continham em sua composição *Clostridium sordellii*, observando-se o período de validade e conservadas conforme especificações do fabricante.

Como controle foi empregada uma bacterina monovalente padrão contra *Clostridium sordellii*, adquirida junto ao U. S. Department of Agriculture Animal Plant Health Inspection Service, IRP 308.

Os laboratórios e vacinas foram codificados conforme Quadro I.

3.4 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Cooked Meat Medium (CMM), Reinforced Clostridial Medium (RCM), Agar sangue com 8% de sangue desfibrinado de carneiro (AS), Meio de Kolbe, Tripitic Soy Broth (TSB), caldo - cérebro - coração BHI (Brain Heart Infusion).

Quadro I: Codificação das vacinas contra clostridiose e seus respectivos laboratórios, comercializadas no Brasil e avaliadas quanto à eficiência, em 2000.

Laboratórios	Vacinas	Composição
L ₁	T ₁	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo A, B, C e D, <i>C. haemolyticum</i>
L ₂	T ₂	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo B, C e D, <i>C. haemolyticum</i>
L ₃	T ₃	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D, <i>C. botulinum</i> C e D
	T ₄	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D
L ₄	T ₅	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo B e D
L ₅	T ₆	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D
L ₆	T ₇	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D
L ₇	T ₈	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i>
L ₈	T ₉	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D
L ₉	T ₁₀	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo C e D
L ₁₀	T ₁₁	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> Tipo B, C e D
L ₁₁	T ₁₂	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipo B, C e D
L ₁₂ (Bacterina padrão)	T ₁₃	<i>C. sordellii</i>

3.5 Amostra Padrão de *Clostridium sordellii* para produção de suspensão de esporos

Para desafio, foi utilizada uma amostra de *Clostridium sordellii* (ATCC-9714) adquirida junto ao American Type Culture Collection (ATCC) dos estados Unidos da América.

3.5.1 Cultivo da amostra padrão

A amostra de *Clostridium sordellii* liofilizada foi reconstituída pela adição de um mL de meio CMM, conforme recomendação da ATCC e semeada em dois tubos contendo 15 mL de meio TSB e incubados a 37°C, em ambiente de anaerobiose por 18 horas (Sterne & Batty, 1978).

3.5.2 Manutenção da amostra padrão

As culturas obtidas em TSB foram semeadas em quatro tubos contendo 15 mL de meio RCM e incubadas a 37°C, em anaerobiose por 48 horas. Após incubação, os tubos onde houve crescimento bacteriano foram centrifugados a 8000x g, sob refrigeração (4°C), por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado, seguindo-se três lavagens com solução salina tamponada estéril, pH 7,0. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final, de cada tubo, foi ressuscitado na proporção de 1:2 em leite em pó a 10% e liofilizado segundo Rudge (1983).

3.5.3 Método de Produção de esporos

Para a produção de esporos foi utilizada a técnica descrita por Kolbe et al. (1981), com modificações.

3.5.3.1 Preparação do meio de Kolbe

Para a preparação do meio de Kolbe, 100g de fígado bovino foram cortados em cubos de aproximadamente 2,0 x 2,0 x 2,0 cm e colocados em 200 mL de água destilada. A seguir, foi adicionado 0,2g de papaína dissolvida em 5,0 mL de água destilada e o pH final de 7,2 foi obtido pela adição de hidróxido de sódio 1N.

A mistura fígado/papaína foi aquecida e mantida em Banho-Maria a 64°C, por 120 minutos e, após este período, centrifugada a 2500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi clarificado, por passagem em papel filtro, e ajustado para pH 7,3, com solução de hidróxido de sódio 1N. Para cada 100 mL do filtrado final, adicionou-se: tripticase, 4,0g; ágar bacteriológico, 2,0g; extrato de levedura, 1,0g. O meio foi distribuído em frascos tipo erlenmeyer de 500 ml, contendo cada um 100 mL de meio, e tampados com capuchão de algodão hidrófobo, envoltos em gaze e papel alumínio, estendendo-se até 8,0 cm abaixo do gargalo do frasco e autoclavados a 121°C, por 25 minutos.

3.5.3.2 Cultivo da suspensão bacteriana

Após abertura da autoclave, os frascos contendo o meio de cultura foram imediatamente colocados em jarras de anaerobiose, preenchidas com mistura gasosa (CO₂ - 9,8%; H₂ - 10,4%; N₂ - 79,8%) e mantidas nesta atmosfera durante as 18 horas que antecederam a sementeira. Após este período, cada frasco foi inoculado com 2,0 ml de uma cultura de 18 horas de *Clostridium sordellii*, incubadas a 37°C, em meio TSB.

A cultura foi distribuída sobre o agar, movimentando-se os frascos de maneira a haver uma distribuição uniforme sobre sua superfície, e incubada em atmosfera de anaerobiose a 37°C, por 48 horas e, após este período, a 27°C, por mais 96 horas.

3.5.3.3 Coleta da suspensão bacteriana

Após este período de incubação, adicionou-se a cada frasco pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro e uma solução de 25 mL de tampão fosfato (0,05M - KH₂PO₄ - Na H₂ PO₄), pH 7,0, estéril.

A suspensão bacteriana foi removida da superfície do meio sólido agitando-se os frascos com movimentos circulares. Foi coletado um total de 50 mL e transferido para um erlenmeyer de 250 mL de capacidade, previamente esterilizado, contendo 50 mL de glicerina e uma barra magnética para homogeneização completa, mantido à temperatura ambiente, durante 14 dias. A presença de esporos foi verificada através de coloração específica de esporos (Kolbe, 1981).

3.6 Provas de Pureza

A suspensão de esporos glicerinada, foi inoculada em placas de agar sangue - 8% sangue desfibrinado de carneiro- em tubos contendo meio TSB e em caldo BHI e incubados em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 72 horas (Smith, 1975).

3.7 Provas de Potência

3.7.1 Titulação da suspensão de esporos

A titulação da suspensão de esporos glicerinada foi realizada utilizando-se diluições decimais em solução salina tamponada a 1%, pH 7,0. A dose letal a 50% - DL₅₀ (menor quantidade de esporos capaz de matar 50% dos animais inoculados, em até 72 horas após a inoculação) e foi calculada pelo método de Reed & Muench (Reed & Muench, 1938).

Para cada diluição foram inoculados cinco cobaias, pesando entre 350 - 500 g, com 0,5 mL de suspensão contendo 0,25 mL de cada diluição e 0,25 mL de CaCl₂ a 5%, por via intramuscular. Os animais foram observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida três vezes e os resultados dos três testes foram acumulados para efeito de cálculo de DL₅₀. Foi aplicado o cálculo do coeficiente de variação para determinar se as amostras de suspensão de esporos glicerinadas analisadas formavam uma população homogênea. Os valores para a média foram

calculados com intervalo de confiança $p < 0,05$ (Sampaio, 1998)

3.8 Manutenção da suspensão de esporos

Depois de confirmados os resultados dos testes de pureza e potência, a suspensão de esporos em alíquotas de 1 mL, foi acondicionada em tubos *ependorf* e mantidas a -70°C . As suspensões foram retestadas após 12 meses para avaliação de potência.

3.9 Controle da eficácia da vacina contra *Clostridium sordellii*

A metodologia utilizada para avaliação da eficácia das vacinas testadas e as normas de interpretação da prova obedeceram ao preconizado pela Portaria nº 49 de Maio de 1997 (Brasil, 1997).

As provas de inocuidade e esterilidade foram consideradas como existentes e todas as vacinas todas possuem em sua composição *Clostridium chauvoei*, controladas oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

3.9.1 Delineamento da prova

A prova foi realizada em uma única etapa. Foram testados 12 diferentes lotes de vacinas comerciais, utilizando-se dois frascos de cada e uma bacterina padrão (Quadro 1).

3.9.2 Esquema de vacinação e desafio

Para cada vacina, foram utilizadas oito cobaias vacinadas, por via subcutânea, com 1/5 da dose bovina. Após 21 dias, foram revacinadas com a mesma dose. Aos 14 dias após a última dose, todos os animais vacinados e um grupo de cinco animais testemunhas receberam, por via intramuscular, 0,5 mL de uma suspensão contendo 100 DL₅₀ da suspensão de esporos e 0,25 mL de solução de CaCl₂ a 5%. As cobaias inoculadas foram observadas durante 72 horas, registrando-se as mortes ocorridas no período.

3.9.3 Normas de Interpretação da prova

Para a interpretação da prova de eficiência foi seguida a seguinte norma, segundo a Portaria nº 49 (Brasil, 1997), que estabelece:

- A prova será considerada válida se, no mínimo, quatro das cinco testemunhas inoculadas não sobreviverem;
- A vacina será considerada eficaz se houver a sobrevivência de, no mínimo, sete dos oito animais vacinados;
- A vacina será retestada se houver a sobrevivência de, no mínimo, seis dos oito animais vacinados e considerada eficaz, se o cumulativo total dos mortos da primeira e da segunda prova não ultrapassar quatro animais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de *Clostridium sordellii* utilizada para produção de esporos mostrou um bom crescimento quando inoculada no meio CMM e TSB.

A produção da suspensão de esporos no meio descrito por Kolbe et al. (1981) apresentou resultados satisfatórios confirmados por meio da técnica de coloração de esporos, onde se evidenciou a presença maciça de esporos subterminais característicos deste agente. O grande crescimento na superfície do meio de Kolbe (Kolbe et al., 1981) deve-se ao fato do mesmo ter sido preparado em frascos tipo erlenmeyer de gargalo com diâmetro estreito, que após o ciclo de esterilização com descompressão rápida, foi imediatamente acondicionado em jarras de anaerobiose com mistura gasosa até o momento da inoculação.

Estes procedimentos restringem consideravelmente o contato do meio com o ar, evitando-se sua oxidação, fato também observado por Neves (1997), na produção de esporos de *Clostridium haemolyticum*.

A presença de fígado na composição do meio de Kolbe aumenta o potencial de oxiredução. O meio de Kolbe foi escolhido por não ser aconselhável a utilização do agar-sangue, que é produzido a partir do ágar simples autoclavado em balões volumétricos. Depois de estabilização a 56°C adicionou-se sangue e distribuiu em placas de Petri, que são incubadas em estufa a 56°C , durante 20 minutos, para remoção da umidade. Testes posteriores de esterilidade são realizados mantendo estas placas ou parte delas

em estufa em aerobiose para avaliar a presença ou ausência de possíveis contaminantes.

Somente então, as placas serão semeadas e incubadas em anaerobiose. Este processo diminui o potencial de oxiredução do meio. Já os meios líquidos em tubos, permitem crescimento considerável de anaeróbios, pois o contato do agente com o ar é mínimo, em razão da coluna líquida.

Em uma segunda etapa, após a obtenção da suspensão bacteriana em meio sólido, o induto produzido estava fortemente aderido a este, tornando-se impossível à coleta mesmo sob forte agitação. A utilização de pérolas de vidro mostrou-se eficiente para remoção da suspensão bacteriana da superfície do agar, não interferindo na titulação final da suspensão de esporos. Técnica semelhante foi utilizada na produção de amostras bacterianas de *Bacillus anthracis* e na produção de amostras bacterianas de *Clostridium haemolyticum* (Neves, 1997).

A suspensão de esporos quando inoculada em BHI e ágar-sangue a 8% e incubadas em ambiente de aerobiose, não apresentou nenhum crescimento bacteriano. Em anaerobiose, não houve crescimento no agar sangue, apenas em BHI, em razão da coluna líquida que favoreceu o desenvolvimento do agente.

A suspensão de esporos foi titulada a partir da inoculação em cobaias e os resultados são apresentados na Tabela 1.

A média do título da suspensão de esporos para primeira titulação foi $1,14 \times 10^5$ DL₅₀/mL, apresentando um desvio padrão de 0,075 e com um coeficiente de variação da amostra de 1,4%. A diluição da amostra desafio em que estavam contidas as 100DL₅₀ em 0,25 mL foi de 1:285. A suspensão de esporos glicerinada mantida a -70°C mostrou-se estável por um período de 12 meses, apresentando títulos $1,13 \times 10^5$, similares aos obtidos anteriormente. A diluição para a amostra desafio em que estavam contidas as 100DL₅₀ em 0,25 mL foi, para a segunda titulação de 1: 284, conforme Tabela 2.

Tabela 1 - Título em DL₅₀ das três repetições da suspensão de esporos de *Clostridium sordellii*, antes e após armazenamento por 12 meses a -70°C, em cobaias inoculadas por via intramuscular (IM).

Repetições	DL ₅₀ /Ml	
	1ª Titulação	2ª Titulação
1ª	$1,25 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$
2ª	$9,33 \times 10^4$	$1,19 \times 10^5$
3ª	$1,25 \times 10^5$	$9,82 \times 10^4$

Tabela 2 - Comparativo de resultados obtidos nas titulações da suspensão de esporos realizadas no intervalo de 12 meses.

Repetições	1ª. Titulação	2ª. Titulação
Média	$1,14 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$
Desvio padrão	dl ₅₀ /ml,	dl ₅₀ /ml,
Diluição	1:285	1:284
amostra desafio		
Coefficiente de variação	1,4%	1,4%

Os resultados do teste de potência das vacinas avaliadas são apresentados na Tabela 3.

Das 13 vacinas testadas, apenas a bacterina padrão e três vacinas comerciais atenderam aos requisitos mínimos. Duas vacinas, as quais foram codificadas como "T₆" e "T₈" apresentaram resultados iguais à vacina padrão, protegendo todos os animais desafiados. A vacina codificada "T₁₀" não atendeu aos requisitos para ser considerada eficiente, no primeiro teste. Entretanto, no reteste, o acumulado de animais não foi superior a quatro óbitos, sendo portanto considerada eficiente, segundo a Portaria n° 49 (Brasil, 1997).

Tabela 3- Resultado do teste de potência das vacinas comerciais contendo em sua composição *Clostridium sordellii*, em 2000.

VACINA	TESTE*	REPETIÇÃO
T ₁	0/8	
T ₂	0/8	
T ₃	0/8	
T ₄	0/8	
T ₅	0/8	
T ₆	8/8	
T ₇	0/8	
T ₈	8/8	
T ₉	0/8	
T ₁₀	6/8	6/8
T ₁₁	0/8	
T ₁₂	0/8	
T ₁₃	8/8	
TESTEMUNHA	0/5	

*cobaias protegidas/cobaias inoculadas

O teste de potência empregado neste experimento, para a avaliação de bacterinas contra *Clostridium sordellii*, a partir da vacinação de cobaias e desafio com 100DL₅₀ de uma suspensão de esporos padronizado, mostrou-se prático e de fácil execução. O uso de um grande número de animais, entretanto, torna este tipo de teste caro, além de gerar questões bioéticas.

Na prova desafio foi utilizada a concentração final de 5% de CaCl₂, uma vez que Neves (1997) demonstrou que, nesta concentração, os resultados obtidos eram mais uniformes. Em trabalho semelhante, Mackeak *et al.* (1972) utilizaram concentração final de CaCl₂ a 2,5%. Não foi observado neste trabalho, diferença significativa nos resultados, quando a concentração utilizada foi de 5%.

Existe uma tendência mundial em substituir os testes "in vivo" por testes "in vitro", com resultados obtidos em apenas algumas horas, ao contrário de dias necessários em testes com animais de laboratório, além de requererem um único operador e poderem ser automatizados. Testes alternativos serão de grande benefício e resultarão em substancial redução do número de animais utilizados na avaliação da eficiência das vacinas ou, até mesmo, a abolição do uso dos mesmos.

O uso de vacinas clostridiais com múltiplos antígenos é uma prática adotada em todo o mundo, entretanto a prevalência de um ou outro agente e a sua manifestação clínica varia de país para país e de região para região.

A ocorrência de enfermidades causadas por *Clostridium sordellii* tem sido relatada em alguns países, acometendo principalmente ovinos com quadros de morte súbita.

O primeiro relato com isolamento de *Clostridium sordellii* foi feito na Inglaterra em 1955 por Brookes *et al.* (1956), e posteriormente Richards & Hunt (1982), descreveram casos de morte súbita em cordeiros de quatro a dez semanas com o isolamento do agente. El Idrissi *et al.* (1992) descrevem casos de ovinos infectados por *Clostridium sordellii* como causador da morte súbita ocorrida na Europa e 14 isolamentos deste agente em ovinos no Marrocos. Popoff (1984) relata isolamento de *Clostridium sordellii* em 12 dos 19 animais examinados no sul da França.

Na Austrália, Beveridge (1983) descreveu casos de gangrena gasosa ocorridos em ovinos com isolamento de *Clostridium sordellii*, e Lewis & Naylor (1998), relatam 37 casos de morte súbita também em ovinos, com idade variando entre 4 a 10 semanas. Observaram a presença de lesões mais severas nos animais mais jovens e no animais mais velhos as lesões encontradas eram mais brandas.

Na América do Sul relata-se casos severos com conseqüente morte súbita em ovinos na Terra do Fogo com o isolamento do *Clostridium sordellii* principalmente de fígado, baço e intestino dos animais acometidos pela enfermidade. (Monteverde & Congliaro-de-Fernandez, 1976).

No Brasil, não existe um diagnóstico real da prevalência deste agente no nosso meio, em razão do pequeno número de laboratórios capacitados para realizarem o diagnóstico desta enfermidade. A mesma constatação também é válida para outras infecções clostridiais, onde pouco ou nenhum esforço tem sido investido no desenvolvimento de métodos de diagnóstico *in vitro*.

Investimentos nesta área são imprescindíveis para a coleta de dados epidemiológicos que servirão de base para a produção de imunógenos que visem o bem estar do homem e dos animais. No caso do *Clostridium sordellii* não existem trabalhos no país, com a finalidade de definir a prevalência deste agente no nosso meio, embora as formas de controle, principalmente através de uso de vacinas, sejam preconizadas por muitos laboratórios.

Atualmente 11 laboratórios produzem vacinas clostridiais com múltiplos antígenos, contendo em sua composição *Clostridium sordellii*, podendo inferir que a incorporação deste agente nas vacinas clostridiais foi implementada pelas indústrias nacionais, em razão da disputa de mercado com as vacinas importadas que contêm este agente em sua composição.

Devido às modificações no modelo econômico adotado no país, com conseqüente abertura de mercado, incluindo a indústria farmacêutica, houve um aumento significativo na produção de imunobiológicos, entretanto, sem um controle sistemático por parte das autoridades sanitárias.

Apenas *Clostridium chauvoei* é controlada oficialmente além de toxóide botulínico que é controlado sistematicamente pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento pelo Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Pedro Leopoldo (LARA/PL). Apesar de existir uma portaria para o controle oficial de todos os antígenos das vacinas clostridiais (Brasil, 1994/1997), fica assim, o controle de qualidade dos produtos imunobiológicos, a cargo das indústrias produtoras.

Em outros países, como nos Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Reino Unido, todos os constituintes das vacinas clostridiais são

avaliados quanto à sua eficiência por órgãos oficiais.

Os resultados encontrados neste experimento, onde apenas três das 12 vacinas comercializadas no país mostraram-se eficientes, demonstram a baixa imunogenicidade destes imunobiológicos. Trabalhos realizados por outros pesquisadores, com vacinas clostridiais também encontraram resultados similares. Lobato (1989), ao avaliar as vacinas antitoxinicas comercializadas no Brasil, constatou que nenhum dos produtos testados foi eficiente para estimular resposta imunológica adequada nos animais vacinados. Azevedo et al. (1998) ao avaliarem a eficiência de toxóides contra *Clostridium perfringens* tipo C e D comercializados no país, constataram que nenhum dos produtos testados apresentaram níveis mínimos de anticorpos neutralizantes nos animais imunizados. Lobato et al. (2000) ao avaliarem seis toxóides de *Clostridium perfringens* tipos C e D comercializados no Brasil, verificaram que apenas dois foram capazes de induzir níveis de anticorpos compatíveis com os exigidos no teste de potência.

Não se tem feito um trabalho sistemático para reforçar a necessidade de se conhecer a real situação de doença/infecção para a utilização de vacinas. Ao invés de aumentarem o número de componentes presentes nestes produtos, deveriam melhorar a qualidade dos antígenos que realmente são hoje importantes no país.

Estes resultados sugerem a implementação de um controle efetivo dos componentes antigênicos presentes nas vacinas clostridiais por parte das autoridades responsáveis pelos imunobiológicos presentes no mercado, pois muitos destes produtos chegam às mãos de seus consumidores sem nenhuma eficácia.

5. CONCLUSÃO

As vacinas contra clostrídios que contêm em sua composição *Clostridium sordellii*, comercializadas no Brasil mostraram-se, em sua maioria, ineficientes em estimular resposta imunológica suficiente para proteção dos animais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SAMRA, M T; SANOUSI, S M ; IDRIS, S O *et al.* Infectious necrotic hepatitis (black disease) among sudanese sheep. *Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, v.37, p.422-429, 1984.
- AI MASHAT, R R ; TAYLOR, D J. *Veterinary Record*, v. 112, p.19, 1983.
- AMADO, A A B; NAZARETH, A. Sudden death in a sheep associated with *Clostridium tetani* and *Clostridium sordellii*. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária*, v.18, n.1, p.29-30, 1986.
- AMADO, A A B. *Clostridium sporogenes* in disease of sheep. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.85, p.170-172, 1990.
- AZEVEDO, E O; LOBATO, F C F; ABREU, V L V *et al.* Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.
- BEVERIDGE, W I B. Farm animal health in Australia. Beveridge: W.I.B.,1983.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Laboratório de Referência Animal. Portaria nº51, 16/07/1994 [Comunicado Interno].
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 49 de 12 de mai. de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 mai. 1997. Seção I, p. 10168-10169.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Laboratório de Referência Animal, Porto Alegre. 15 de Maio de 2001. [Comunicado Interno].
- BROOKES, M E; STERNE, M; BETTY, R W. Occurrence of *Clostridium sordellii* in Great Britain. *Veterinary Recorder*, v. 68, p.121-122, 1956.
- CLARK, F E; HALL, I E. *Annales de l'Institut Pasteur* n. 85, p.890, 1927.
- EL IDRIS, A H; WARD, G E; JOHNSON, D W *et al.* *Preventative Veterinary Medicine*, v. 38, n.12, p. 35, 1992.
- ESTADOS UNIDOS [Leis, etc]. *Code Federal Regulations*. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1996. p. 425-426.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3. ed. Maisonneuve : Sainte Ruffine;, 1998.p. 363.
- HOLDEMAN, L V; CATO, E P; MOORE, W E C. *Anaerobic laboratory management*. 4. ed. Virginia,1977.
- HORSCH,F. *Imunoprofilaxis de los Animales Domésticos*. Zaragoza: Acriba, 1984. 373 p.
- KOLBE, D R; CLAUS, K D; NERVIG, R M. A method for the production of *Clostridium haemolyticum* spores on solid medium. *Journal of biological Standartization*, v.9, n. 6, p.115-119, 1981.
- LEWIS, C J; NAYLOR, R D. Sudden death in sheep associated with *Clostridium sordellii*. *Veterinary Record*, v.35, n.142, p. 417-421, 1998.
- LOBATO, F C F. Avaliação de imunógenos antitoxinogênicos em uso no Brasil. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1989. 59p. Dissertação (Mestrado).
- LOBATO, F C F. Isolamento e caracterização de amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D no Brasil. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1997. 113p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal)
- LOBATO, F C F; ASSIS, R A. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, v. 47, n.113, p. 29-33, 2000.
- LOBATO, F C F. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.4, p. 313-318, 2000.

MACHEAK, M E; CLAUS, K D; MALOY, S E. Potency testing *Clostridium novyi* containing bacterins: comparison of immunologic response in guinea pigs and sheep. *American Journal Veterinary Research*, v.33, n.6, p. 1201-1208, 1972.

MACHEAK, M E. *Clostridium oedematiens*: observations on potency assaying. In: JOINT OIE-IABS SYMPOSIUM ON CLOSTRIDIAL PRODUCTS IN VETERINARY MEDICINE, 1975, Paris. *Proceedings...* Paris: International Association of Biological Standardization, 1976, p.103-106.

MONTEVERDE, J J; CONGLIARO-DEFERNANDEZ. *Revista de Medicina Veterinária Argentina*, n. 57, p. 231, 1976.

NEVES, R D. Aplicação de um método de produção de esporos de *Clostridium haemolyticum* na avaliação da eficácia da vacina contra hemoglobinúria bacilar. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 65p. (Tese, Mestrado em Ciências Veterinárias).

PINOCHET, L; ABALOS, P. Vacunas y vacunación. *Monografía medicina Veterinária*, v. 11, p. 54-67, 1989.

PINOCHET, L; BERRIOS, P; FABREGA, F *et al.* Estudio comparativo de protección producida por algunas vacunas al administrarlas individual y simultaneamente. *Avances en Ciencias Veterinarias*, v.7, n.2, p.185-190, 1992.

POPOFF, M R. Bacteriological examination in enterotoxaemia of sheep and lamb. *Veterinary Record*, v.114, p. 324, 1984.

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.

RICHARDS, S M; HUNT, B W. *Veterinary Record*, n.111, p. 22, 1982.

RUDGE, R H. *Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods*. London: J.J.S. Snell, 1983. Cap.4: Maintenance of bacteria by freeze-drying, p.23-34.

SMITH, L D; SAFFORD, J W; HAWKINS, W S. *Cornell Veterinarian*, v. 32, n.52, p. 62, 1962.

SMITH, L D. *The pathogenic anaerobic bacteria*. 2 ed. Illinois: SMITH, L D. *The pathogenic anaerobic bacteria*. 2. ed. Illinois: Charles C. Thomas, 1975. Cap. 13: *Clostridium* spp, p.271-280.

SNEATH, P H A; MAIR, N S; SHARPE, M E; HOLT, J G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1169-1170.

SORDELLI, A. *Comptes Rendus de al Societé Biologique*, v. 28, n.87, p. 838, 1922.

STERNE, M; BATTY, I. *Clostridios patógenos*. Zaragoza: Acribia, 1978. 135 p.

TATAKI, H; MUET, M. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 12, n. 85, p. 890, 1953.

WEST, D M. In: INTERNATIONAL MEETING OF THE SHEEP VETERINARY SOCIETY, 3, 1993. *Proceedings...* 1993. p.111.