

Liliane Dane Dias

T636.089 69

D541a

2003



**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE VACINAS
CONTRA *Clostridium septicum***

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2003

D541a Dias, Liliane Dane, 1969-
Avaliação da eficiência de vacina contra *Clostridium septicum* / Liliane
Dane Dias. – 2003.
29p. :il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Vacinas veterinárias – Teses. 2. Clostridiose – Vacinas – Teses.
3. Antitoxinas – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 537 2

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
06/0603
ESCOLA DE VETERINARIA
BIBLIOTECA 1823003-02
DA UFMG

0350-99860

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2003, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
(Orientador)



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Profa. Zélia Inês Porteira Lobato



Prof. Maurílio de Andrade Rocha

*À minha mãe por me ensinar que o sonho pode ser realizado.
À minha família e ao Marcelo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Francisco;

Ao amigo Nelson Éder Martins;

Aos amigos do laboratório: Ronnie, Patrícia Parreiras, Flavia, Renata Maria, Luciana Rapini, Antônio, Thiago, Paulo, Augusto, Luciana Aramuni, Guilherme, Michelle, Milton, que são muito mais que companheiros de trabalho;

À Prof^ª Vera Lúcia Viegas de Abreu;

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, e a todos os professores que contribuíram para a minha formação;

Ao Dr. Tomas de Aquino Porfiro, Diretor do LARA/PL, por permitir a utilização das dependências deste laboratório;

Aos amigos do LARA-PL: Ricardo Aurelio, Pedro Mota, Ângela, Patricia, Mauricio, Ernane, Rejane, Bete, Anapolino, Clério, Edson, João, Ercílio, pela cooperação durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Luís Heneine e colegas do Laboratório de Imunologia da FUNED;

As companheiras de república;

Aos amigos do curso de Medicina Veterinária e curso de Pós-Graduação, aos funcionários do DMVP, da secretaria do DMVP, da secretaria do Colegiado de Pós-Graduação e da biblioteca da UFMG.

Minha eterna gratidão a todos com quem tive a oportunidade de conviver.

*O conhecimento amplia a vida.
Conhecer é viver uma realidade
que a ignorância impede desfrutar.
Da sabedoria logosófica.*

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	SUMMARY	9
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	15
3.2	ANIMAIS	16
3.3	VACINAS	16
3.4	MEIOS DE CULTURA	17
3.5	AMOSTRAS DE <i>Clostridium septicum</i> , TOXINA E ANTITOXINA	17
3.5.1	Cultivo e manutenção da amostra	17
3.5.2	Aquecimento da amostra	17
3.5.3	Produção e concentração da toxina	17
3.5.4	Toxinotipia	18
3.5.5	Titulação da toxina em camundongos	18
3.5.6	Padronização e determinação da dose teste da toxina	18
3.5.7	Precipitação da toxina com sulfato de amônio	19
3.5.8	Dosagem da proteína	19
3.5.9	Inativação da toxina	19
3.5.10	Purificação da toxina pelo sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)	19
3.6	PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS	19
3.6.1	Preparo do meio de Kolbe	19
3.6.2	Cultivo da suspensão bacteriana	20
3.6.3	Coleta da suspensão bacteriana	20
3.6.4	Provas de pureza da suspensão bacteriana	20
3.6.5	Titulação da suspensão de esporos	20
3.7	AVALIAÇÃO DE VACINAS	20
3.7.1	Esquema de vacinação e sangria de coelhos para avaliação do toxóide	20
3.7.2	Esquema de vacinação e desafio para avaliação da bacterina	21
3.7.3	Esquema de vacinação dos bovinos	21
3.8	TRIAGEM DOS SOROS	21
3.9	TITULAÇÃO DO SORO DOS COELHOS E DOS BOVINOS	21
3.10	Interpretação das provas	21
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.	CONCLUSÕES	27
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxinotipia da amostra de <i>Clostridium septicum</i> usada no teste de vacina	22
Tabela 2	Titulação da toxina de <i>Clostridium septicum</i> , concentrada 80 vezes, acrescida de PMSF	22
Tabela 3	Titulação da toxina de <i>Clostridium septicum</i> , concentrada 80 vezes e precipitada com solução saturada de sulfato de amônio a 50	23

Tabela 4	Teste de potência de vacinas comerciais contra clostridioses em cobaios vacinados e desafiados com suspensão de esporos.....	25
Tabela 5	Títulos em UI/mL de antitoxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em 'pool' de soro de coelhos inoculados com vacinas comerciais.....	25
Tabela 6	Títulos em UI/mL de antitoxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em soro dos bovinos inoculados com vacinas comerciais.....	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Codificação das vacinas contra clostridioses comercializadas no Brasil e avaliadas quanto à eficiência.....	16
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	SDS-PAGE realizado em gel com 12% corado pela prata. Canaleta: 1- Marcador de peso molecular; 2-TIF Toxina inativada com formol; 3-TI Toxina iodada; 4-TPa Toxina padrão; 5-TIF com redução; 6-TI com redução; 7- Vacina T ₄ com redução; 8- Vacina T ₂ com redução; 9-Vacina T ₁ com redução; 10- TPa com redução.....	24
----------	--	----

RESUMO

Foram avaliadas quanto à eficiência 12 vacinas comerciais contra clostridioses, que continham toxóides e/ou bacterinas de *Clostridium septicum*, pelo teste de soroneutralização em camundongos a partir de soros de coelhos e bovinos vacinados e pelo teste de desafio direto em cobaias. As vacinas codificadas como T₁, T₁₀ e T₁₁ apresentaram, em coelhos, títulos de antitoxina alfa superiores ao nível mínimo de teste de 2.5 UI/mL recomendado pelo controle deste produto e as vacinas T₂ e T₄ títulos de 2.0 e 2.5 UI/mL. Resultados semelhantes foram obtidos nos soros dos bovinos em relação às vacinas T₁, T₂, T₄ e T₁₀. A vacina T₁₁ não foi testada em bovinos. Pelo método do desafio direto em cobaias, nenhuma vacina atendeu aos requisitos mínimos. As vacinas contra *Clostridium septicum*, em sua maioria, foram ineficientes em estimular resposta compatível com níveis de teste.

Palavras-Chave: Vacina, avaliação, antitoxinas, *Clostridium septicum*.

ABSTRACT

Twelve commercial vaccines against clostridiosis were evaluated having in their composition *Clostridium septicum* toxoids and/or bacterial cells. have been evaluated for potency by mice serum neutralization tests using rabbit or bovine sera and challenge test in guinea-pig. The vaccines, coded as T₁, T₁₀ and T₁₁, elicited alpha antitoxin titers in rabbits which were superior to the minimum test level of 2.5 IU/mL, as recommended for quality control, and the vaccines T₂ and T₄ eliciting titers of 2.0 and 2.5 IU/mL. Similar results were obtained as detected in bovine sera against vaccines T₁, T₂, T₄ and T₁₀. The T₁₁ vaccine was not evaluated in bovines. According to the challenge tests in guinea pigs no vaccine met the minimum requirements for approval. *Clostridium septicum* vaccines were in general inefficient for stimulating the immune response as evaluated by the recommended tests.

Keywords: Vaccine, assessment, antitoxin, *Clostridium septicum*.

1- INTRODUÇÃO

Muitos dos 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, sendo a maioria constituinte da microbiota intestinal, porém aproximadamente quatorze são capazes de produzir enfermidades nos animais (Smith, 1984). As mionecroses ou gangrenas são patologias determinadas por bactérias desse gênero e são resultantes da multiplicação e produção de toxinas por algumas espécies na musculatura, com conseqüente lesão muscular e toxemia. Vários fatores podem desencadear estas infecções como intervenções cirúrgicas, traumas, isquemias vasculares, necroses teciduais, tumores e infecções bacterianas aeróbias ou anaeróbias. Estes fatores propiciam a diminuição do oxigênio molecular, reduzindo o potencial de oxido-redução nos tecidos, favorecendo a germinação dos esporos aí localizados e a conseqüente produção de toxinas.

As gangrenas estão distribuídas mundialmente. Edema maligno, ou gangrena gasosa, e carbúnculo sintomático são as principais formas que acometem as explorações pecuárias, sendo que gangrena gasosa é causada principalmente pelo *Clostridium septicum* e em menor freqüência pelo *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium sordelli*, *Clostridium perfringens* tipo A, e o carbúnculo sintomático é causado pelo *Clostridium chauvoei*. Nos anos de 1990 a 2001, foram registrados em Minas Gerais, 12.291 casos de gangrena atingindo os maiores índices de mortalidade entre as doenças infecciosas dos bovinos no Estado (Solange Olinda, comunicação pessoal - Serviço de sanidade animal-SSA/DFA/MG). Neste mesmo Estado, no município de Itacarambi, um surto de gangrena gasosa em bovinos resultou em alta mortalidade. Em um rebanho de 500 bovinos da raça Nelore com idade entre 14 e 18 meses, morreram 58 animais (11,6%), 30 dias após terem sido vacinados contra doenças clostridiais, raiva e febre aftosa. *Clostridium septicum* foi isolado em cultura pura e

detectado pela técnica de imunofluorescência direta em impressões de músculo da área de inoculação e fígado de quatro animais necropsiados (Assis *et al.*, 2002).

Clostridium septicum produz numerosas substâncias tóxicas: a alfa toxina letal e hemolítica, estável em presença de oxigênio; a beta toxina uma DNase; a gama toxina uma hialuronidase; a teta toxina uma hemolisina; neuraminidases e hemaglutininas. Estas levam a um aumento da permeabilidade vascular e mionecrose podendo ocasionar uma bacteremia fatal. *Clostridium septicum* é um invasor freqüente de carcaças, principalmente de ruminantes. Há evidências de contaminação direta de feridas e da entrada no hospedeiro através de *Fasciola hepática*.

As mionecroses são responsáveis por perdas econômicas consideráveis, uma vez que, em função de sua rápida evolução, o tratamento na maioria das vezes é impraticável. Sua erradicação é praticamente impossível devido às características ecológicas do agente que é ubiqüitário e encontrado na natureza em forma de esporos. O controle deve basear-se em medidas de manejo e em vacinações sistemáticas do rebanho, já que os animais estão em constante contato com os agentes e fatores que podem desencadear a doença.

As vacinas comerciais são compostas por múltiplos antígenos e são usadas como estratégia frente a uma variedade de agentes e/ou suas toxinas que podem causar doenças. Essa tendência atual de usar vacinas combinadas visa minimizar os problemas de manejo, estresse, reações anafiláticas locais e traumas nas inoculações. Para evitar a interferência ou incompatibilidade entre os diversos antígenos as vacinas deverão ser previamente testadas de acordo com normas aprovadas internacionalmente.

Atualmente no Brasil, em relação às vacinas clostridiais, apenas *Clostridium chauvoei* e toxóide botulínico tipos C e D são avaliados

sistematicamente pelo Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento sendo, portanto, a qualidade dos demais produtos de responsabilidade das indústrias produtoras. No período de 1991 a 2000, 1.193.000.000 doses de vacinas polivalentes contra clostridioses foram submetidas ao controle oficial quanto aos agentes anteriormente mencionados (Brasil, 2003), comprovando a grande utilização dessas vacinas por parte dos produtores.

São 19 laboratórios produzindo 39 vacinas polivalentes contra clostridioses, sendo que 12 desses produzem e comercializam vacinas que têm em sua composição *Clostridium septicum*. Um aumento significativo na produção de imunobiológicos se deve a intensificação e modificação no sistema de exploração agropecuária ocorridas no país que levou ao aparecimento de novas doenças e recrudescimento de outras.

Em razão da importância de *Clostridium septicum* como principal agente da gangrena gasosa, aliada à inexistência de um controle oficial que ateste a qualidade das vacinas produzidas no país, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potência de vacinas polivalentes contra clostridioses com *Clostridium septicum* em sua composição.

2- LITERATURA CONSULTADA

As mionecroses ou gangrenas são patologias determinadas por bactérias do gênero *Clostridium* e são resultantes da multiplicação e produção de toxinas por algumas espécies na musculatura, com consequente lesão muscular e toxemia. Vários fatores podem desencadear estas infecções como intervenções cirúrgicas, traumas, isquemias vasculares, necroses teciduais, tumores e infecções bacterianas aeróbias ou anaeróbias (Lobato e Assis, 1999).

Os primeiros estudos com humanos iniciaram-se por volta de 1870 relacionando a gangrena gasosa à guerra e, em 1871, Bottini descreveu sua natureza bacteriana. Em 1877, Pasteur, ao observar animais

mortos por antrax relatou que esse organismo desaparecia pela falta de oxigênio e toxidez do sangue após o crescimento de anaeróbios putrefativos originados do intestino. Anaeróbios encontrados no músculo desses animais, rodeados por acúmulo massivo de fluido, inflamação, bolhas de gás e que tornavam-se imóveis após a exposição ao oxigênio, transformando-se em esporos, foram denominados *Vibrio septique*. Em 1879, o *Bacterium chauvoei* foi descrito como agente causal da gangrena em bovinos e, em 1881, o *Vibrio septique* foi identificado como causador do edema maligno (Hatheway, 1990).

Amostras de *Clostridium septicum* que se distinguem com base na reação de aglutinação foram descritas por Robertson (1920). Elas produzem toxina que se neutralizava por uma antitoxina monovalente e, desta forma, estabeleceu-se a existência de mais de um tipo sorológico desse *Clostridium*. O efeito protetor de vários antígenos de *Clostridium septicum* foi avaliado por Henderson (1934) testando a atividade do soro contra a célula bacteriana e contra a toxina.

Moussa (1959) descreveu uma fórmula antigênica para antígenos somáticos, flagelares e de esporos ('S') para *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei*. Trinta e sete amostras de *Clostridium septicum* e trinta e oito de *Clostridium chauvoei* foram examinadas pelos métodos de aglutinação e adsorção com soros imunes representando os diferentes tipos dos dois microorganismos. Pelos resultados obtidos o autor concluiu que as amostras de *Clostridium septicum* poderiam ser divididas em seis grupos definidos por dois antígenos somáticos "O" (1,2) e cinco antígenos flagelares "H" (a, b, c, d, e) e as de *Clostridium chauvoei* em dois grupos baseados em dois antígenos flagelares "H" (f e g) exclusivos dessa espécie e um antígeno somático "O" (3). Todas as amostras estudadas possuíam o antígeno "S" em comum.

Clostridium septicum tem virulência multifatorial envolvendo a produção de

toxinas e enzimas hidrolíticas que participam parte na destruição de tecidos, produz adesinas e tem habilidade de diferenciar-se em hiperflagelados gigantes com capacidade de migração por espalhamento (Wilson e Macfarlane, 1996). Estudos das exoproteínas de *Clostridium septicum* sugerem que o microorganismo produz cinco exotoxinas que incluem hemolisinas, desoxirribonucleases, hialuronidases e fibrinolisinase. Devido à natureza fulminante e rápido tempo de morte, tem sido sugerido que uma das principais toxinas do *Clostridium septicum* com efeito letal e citolítico é a alfa toxina (Gyles, 1993).

A alfa toxina foi descrita por Bernheimer (1944) como uma proteína com atividade letal e hemolítica. Controvérsias quanto a essa dupla função existiram até que Ballard et al. (1992) confirmaram sua dupla atividade. Os autores purificaram do filtrado de culturas de *Clostridium septicum* uma única proteína através de troca iônica, gel de filtração e cromatografia de alta resolução. Nesta purificação simplificada detectaram-se proteínas com frações que podiam ser determinadas por ensaio hemolítico. Sua caracterização revelou a alfa toxina purificada que tinha 49 KDa, ponto isoelétrico 8,4, $DL_{50} = 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal de camundongo, atividade hemolítica de 2×10^7 Hu/mg.

O efeito lítico da alfa toxina baseia-se na teoria da formação de poros e lise osmótica, exibindo liberação pré-lítica de íons potássio. A liberação de potássio ocorre dentro de 40 segundos e hemólise completa após 150 segundos. A ativação da alfa toxina em complexos de alto peso molecular forma canais seletivos na membrana, a célula se torna osmoticamente desbalanceada e há lise (Ballard et al., 1992; Gordon et al., 1997).

Anticorpos policlonais, produzidos em coelho, reagem unicamente com alfa toxina de todas as amostras de *Clostridium septicum*, proteína de 49 KDa, entretanto não há nenhuma reação cruzada com proteínas de outras espécies de *Clostridium*. Isto sugere que a alfa toxina de *Clostridium*

septicum é única entre as espécies. Camundongos imunizados com dose subletal de alfa toxina apresentam proteção parcial quando desafiados com cultura total de *Clostridium septicum* (Ballard, 1992). A alfa toxina é conhecida como um dos principais fatores antigênicos responsável pela imunidade conferida por vacinas (Amimoto et al., 2002)

Uma crescente ampliação dos sistemas de criação e a alta concentração de animais implicam cuidados em massa que visem a proteção para uma série de doenças que ameaçam as novas técnicas de manejo implantadas. O uso de vacinas polivalentes em bovinos e ovinos para prevenir doenças causadas por *Clostridium septicum* têm ocorrido em grande escala. Com o objetivo de minimizar os problemas de estresse e manejo, assim como evitar reações tipo anafiláticas às inoculações de produtos tóxicos, inflamação local, reações ao adjuvante, dor, febre, entre outros (Lobato e Assis, 1999). A inconveniência de administrar várias vacinas clostridiais pode ser reduzida combinando vários agentes em uma única dose. Combinações efetivas não podem ser obtidas pela simples adição de componentes por causa do volume resultante, que poderia provocar reações excessivas quando quantidade ótima de adjuvante fosse empregada. Entretanto a preparação de vacinas polivalentes não é possível até que o valor imunogênico de cada um dos constituintes seja suficientemente aumentado para permitir sua diluição (Sterne et al., 1962).

A efetividade de vacinas inativadas depende principalmente da quantidade e qualidade de antígenos específicos que contêm e da escolha adequada de adjuvantes para aumentar o efeito imunizante. Elevadas concentrações antigênicas podem ser obtidas desenvolvendo métodos de cultura que venham a produzir altos títulos de antígenos específicos ou submetendo antígenos menos potentes a concentração física ou química. A quantidade de antígenos que um adjuvante pode adsorver é limitada e qualquer antígeno em excesso se torna menos efetivo como estímulo primário. Portanto o desenvolvimento de

novos tipos ou de novos métodos de uso de adjuvantes. é um importante pre-requisito para melhoria de vacinas múltiplas. Além do aspecto de competição entre antígenos e desses por adjuvantes outro problema é a habilidade restrita do animal quanto ao mecanismo de produção de anticorpos frente a cada um dos antígenos da mistura (Sterne et al., 1962).

A produção de toxinas é um dos aspectos mais importantes na produção de vacinas bem como a amostra utilizada, o meio de cultura, o pH, tempo, temperatura e condições de incubação devem ser consideradas (Lobato e Assis, 1999). Embora isto seja uma realidade, poucos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar as condições ambientais necessárias para produção da alfa toxina. Associado a isso, é reconhecido que há sérias dificuldades quanto à preparação desse antígeno pelo fato dos títulos serem variáveis a cada partida. O aumento desses títulos tem sido obtido através de métodos de concentração que em geral não são rentáveis (Cortiñas et al., 1997).

A obtenção de filtrados tóxicos com baixos títulos leva a uma baixa imunogenicidade desses filtrados e à uma pobre resposta de anticorpos nos animais (Sterne et al., 1962) sendo necessário aplicar métodos que permitam sua melhoria, embora todos eles apresentem alguma desvantagem. Procedimentos como ultrafiltração e concentração consomem tempo; a precipitação com sulfato de amônio não permite reprodutibilidade aumentando a reatividade do material, além disso pode ocorrer desnaturação parcial do antígeno com prejuízo da sua imunogenicidade (Cortinas et al., 1997).

Choman (1969) avaliou o crescimento de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* e *Clostridium novyi* em um meio composto por caldo de fígado 18,2%, extrato de levedura 0,4%, NaHPO₄ 12 H₂O 2,0%, KH₂PO₄ 0,1%, ácido tiovanico 0,018%, L-cisteína 0,0364%, pH 7,6 ± 0,2. A bacterina produzida a partir de cultura total com crescimento de 24 e 28 horas e títulos de 100 e 200 DMM/mL para o *Clostridium*

septicum protegeu 90-100% dos cobaios desafiados com esporos desse agente.

Cortiñas et al. (1997) testaram dois sistemas com o objetivo de determinar as melhores condições para a obtenção de antígenos. Para isso empregou o meio Clostridia (Oxoid), com adição de 0,75g/L de cloridrato de cisteína e inoculação imediatamente após sua esterilização e resfriamento. A biomassa final onde houve suplementação parcial de fonte de carbono (0,1% de glicose) e pH controlado foi três vezes maior (2,22g/L) que o sistema com 0,5% de glicose e livre evolução do pH (0,70 g/L). A produção de exotoxinas detectada por eletroforese, especialmente protoxina e toxina ativa, foi significativamente mais elevada no sistema com suprimento parcial de carbono. Apesar disso, a atividade hemolítica foi similar para os dois sistemas adotados, sendo a instabilidade da toxina em sua forma ativa a explicação mais provável para este achado.

O controle oficial de vacinas é realizado através do teste de soroneutralização em camundongos. Um teste de inibição de citotoxina foi padronizado como alternativa para a detecção de anticorpos neutralizantes da alfa toxina utilizando diferentes amostras de *Clostridium septicum*. Soros foram obtidos de animais vacinados com vacinas monovalente e polivalente contra *Clostridium septicum* e monovalente contra *Clostridium chauvoei*. Este método mostrou-se altamente sensível para a detecção de anticorpos no soro e foi validado quando boa correlação foi obtida com o teste em camundongos. Nenhum anticorpo neutralizante da citotoxina de *Clostridium septicum* pôde ser encontrado no soro de animais vacinados contra *Clostridium chauvoei* (Roth et al., 1999).

Amimoto et al. (2002) investigaram o efeito protetor de um alfa toxóide purificado de *Clostridium septicum* em cobaios. A amostra foi cultivada em meio BHI contendo 0,3% de glicose e 0,05% de L-cisteína, pH 7,4 a 37°C por 18 horas. Após a inativação com formol, a vacina foi preparada da mistura de alfa toxóide com gel de fosfato de alumínio como adjuvante. Cobaios foram imunizados

com doses de 4 a 64 µg de vacina e desafiados com 100 DL₅₀ de uma suspensão de esporos. Os sobreviventes tinham sido imunizados com 8 µgdose ou mais de alfa toxóide purificado. Todos esses animais produziram títulos acima de 20 UI de antitoxina ao desafio. Esses resultados sugerem que o alfa toxóide tem um papel importante na proteção contra o desafio com esporos.

Sterne et al. (1962) discutiram alguns princípios na produção de vacinas clostridiais e avaliaram partidas quanto à capacidade de induzir proteção em coelhos e ovelhas. A média da resposta obtida para *Clostridium septicum*, em coelhos, foi 9 UI/mL, similar ao obtido em vacinas monovalentes (9.2 UI/mL), enquanto a média entre 5 grupos de ovelhas foi de 4.8 UI/mL. Nesse trabalho, os autores enfatizaram a necessidade de administrar a dose reforço e a existência de programas contínuos de imunização dos rebanhos para obtenção de proteção adequada.

Uma vacina contendo toxóide de *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* e *Clostridium welchii* tipo D e toxóide de *Clostridium tetani* purificado foi testada com o objetivo de avaliar a eficiência de métodos já empregados na purificação e concentração desses dois últimos antígenos. Grupos de sete ovelhas inoculados com duas doses de toxóide de *Clostridium septicum* foram sangrados e apresentaram títulos de 2,46 e 4,28 UI/mL duas semanas após a segunda inoculação (Hepple, 1960).

Choman et al. (1968) desenvolveram um teste de potência em cobaias e hamsters, para avaliar a capacidade imunogênica de bacterina, a partir de cultura total de *Clostridium septicum*. O conteúdo de toxina usado para produzir esta bacterina variou de 50-1000 DMM/mL. A vacina protegeu 80 a 100% de cobaias e 90 a 100% de hamsters desafiados com uma preparação de esporos vivos livre de toxinas. Entre os animais sobreviventes, os títulos de antitoxinas detectados no soro foram de 0,25 a 1,0 UI/mL. Resultado similar foi obtido no teste de bacterina polivalente com

título entre 50 a 400DMM/mL. Para estes autores, em ambos os casos a proteção dos animais não dependia do conteúdo original de toxina.

Seis vacinas clostridiais, três contendo o *Clostridium septicum*, sendo uma emulsionada com óleo e duas precipitadas com alumínio contendo de dois a sete antígenos foram administradas em grupos de dez coelhos e de oito ovelhas. Títulos obtidos em ovelhas para o *Clostridium septicum* nas vacinas A, B e D variaram entre 2,1-16,1 UI/mL; 0,89-6,6 UI/mL e 0-0,5UI/mL enquanto em coelhos variaram 8,2-25,9 UI/mL; 1,4-4,4 UI/mL e 0,56-1,8UI/mL, respectivamente. Resultados similares foram encontrados em coelhos e ovelhas, sendo maior a variação dentro do grupo de ovelhas, permitindo concluir que coelhos oferecem um modelo adequado para o teste de potência das vacinas clostridiais (Frerichs e Gray, 1975).

Um teste de potência de uma bacterina-toxóide de *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* e *Clostridium novyi* foi realizado em bezerros, ovelhas e coelhos com dose total e reduzida. Coelhos receberam duas doses, bovinos e ovinos uma única dose. A vacina em dose total e diluída 1/15 protegeu 100% dos animais ao desafio com 100 DL₅₀ de suspensão de esporos de *Clostridium septicum* (Brown et al., 1976).

A resposta imunológica de várias partidas de vacinas clostridiais polivalentes foi comparada em ovelhas e coelhos e os resultados permitiram inferir que ovelhas desenvolveram maiores títulos contra antígenos clostridiais, com exceção de *Clostridium septicum*. As médias de títulos sorológicos obtidos para este antígeno foram 5,8 UI/mL para coelhos e 2,8 UI/mL para ovelhas. Nessa avaliação o nível de teste empregado foi de L+2. Para Webster e Frank (1985), a razão original para a escolha de pequenos animais de laboratório é puramente econômica.

Hnatková et al. (1986), prepararam antígenos de *Clostridium septicum* em sacos de diálise para imunização de cavalos e observaram que os títulos de antígeno em

filtrados obtidos desse modo foram 300 DMM/mL, superiores aos obtidos de culturas em frascos, que foram de 150 DMM/mL. Filtrados obtidos de culturas dialisadas foram melhores antígenos para hiperimunização de cavalos do que culturas obtidas dos frascos.

Neves (1997) avaliou a eficácia de vacinas contra a hemoglobinúria bacilar, provocada pelo *Clostridium haemolyticum*, através do desafio direto com uma suspensão de esporos em CaCl₂ a 5%. Em quatro partidas testadas o índice de proteção/cobaio foi acima de 93,0%. Este procedimento foi empregado por Balsamão (2001) na avaliação de vacinas contra o *Clostridium sordellii*.

A eletroforese obtida do filtrado de culturas de *Clostridium septicum* permitiu identificar várias bandas sendo uma com 42KDa e a outra com 48 KDa correspondentes, respectivamente, a alfa toxina ativa e a protoxina (Cortiñas *et al.*, 1997; Ballard *et al.*, 1992; Amimoto *et al.*, 2002).

Claus e Kolbe (1979) utilizaram cinco amostras de *Clostridium septicum*, cujos filtrados continham mais de 100 DMM/mL, para preparar bacterinas, bacterina-toxóides e toxóides. A imunogenicidade foi testada desafiando cobaios vacinados com uma suspensão de esporos em CaCl₂. Quando desafiados com amostra homóloga, 60 a 100% dos cobaios vacinados sobreviveram em cada grupo, enquanto a proteção cruzada entre as amostras variou de 0 a 100%. Uma combinação de bacterina e toxóide preparada de quatro cepas selecionadas induziu a proteção de 70 a 100% de cobaios vacinados expostos ao desafio com 21 amostras. Esses autores relatam que a heterogeneidade entre as cepas do *Clostridium septicum* tem sido demonstrada em testes metabólicos e composição antigênica e que a eficácia imunogênica do *Clostridium septicum* nos produtos biológicos é pobre para induzir resposta em cobaios, quando comparada ao grau de proteção atingido por outros clostrídios patogênicos. Para esses autores, a antitoxina sozinha é incapaz de proteger contra a infecção pelo *Clostridium septicum*.

A avaliação de seis imunógenos anti-carbúnculo sintomáticos comercializados no Brasil foi realizada por Lopes (1977) quanto a esterilidade, inocuidade e proteção frente ao desafio infecção por *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. Não foi possível detectar a dose protetora para 50% dos animais (Dp₅₀) para o *Clostridium septicum*. A bacterina produzida pelo autor protegeu 20% dos animais imunizados, enquanto nenhuma das vacinas comerciais foi capaz de proteger cobaios vacinados desafiados com suspensão de esporos.

Experimentos realizados no país com vacinas clostridiais demonstraram a baixa antigenicidade dos produtos testados. Lobato (1989) testou oito partidas de vacinas quanto aos toxóides botulínicos tipo C e D verificou que nenhuma era eficiente para induzir a produção de anticorpos para atender aos requisitos exigidos no teste de potência. O mesmo foi verificado em relação aos toxóides de *Clostridium perfringens* tipo C e D por Azevedo *et al.* (1998), quando testaram a potência de seis vacinas comercializadas no país. Lobato *et al.* (2000), avaliaram vacinas que continham em sua composição toxóides bivalentes contra *C. perfringens* tipo C e D e verificaram que somente duas vacinas comerciais e um toxóide bivalente padrão atenderam aos requisitos do teste. Balsamão (2001) avaliou 11 vacinas comerciais que tinham em sua composição *Clostridium sordellii* e apenas três atenderam aos requisitos do teste de potência demonstrando o baixo poder imunogênico dos produtos disponíveis no mercado nacional.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local da realização do trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no Laboratório de Clostridioses do Laboratório Regional de Apoio Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Pedro Leopoldo-MG (LARA/MG); na Fundação

Ezequiel Dias (FUNED) e em uma propriedade rural do município de Vespasiano/MG.

3.2- Animais

-Camundongos de ambos os sexos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17-22g, fornecidos pelo LARA/MG;

- Cobaias albinas da linhagem "English short ear", ambos os sexos, com peso entre 250 e 300g, fornecidas pelo LARA/MG;

- Coelho machos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 1,5-2,5 Kg adquiridos da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa EV-UFGM;

- Bovinos mestiços de ambos os sexos, com idade entre 7-9 meses, sem histórico de vacinação contra *Clostridium septicum* e negativos ao teste de soroproteção para toxina alfa (Tammemagy e Grant, 1967), foram cedidos para o estudo por um

proprietário rural do município de Vespasiano/MG e, durante a realização dos testes, foram mantidos em um pasto separado dos demais animais da propriedade.

3.3- Vacinas

Doze vacinas contra clostridioses, que apresentavam na sua composição *Clostridium septicum*, foram adquiridas diretamente do comércio, após a avaliação das condições de conservação no revendedor e prazo de validade, e mantidas de acordo com as especificações do fabricante. Como controle foi utilizada uma vacina, previamente testada, importada dos Estados Unidos da América (EUA).

As vacinas e laboratórios foram identificados conforme Quadro 1.

Quadro 1 – Codificação das vacinas contra clostridioses e controles testados quanto à eficiência.

Laboratórios	Vacinas	Composição
L1	T1	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. Clostridium septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> C e D
L2	T2	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> C e D
L3	T3	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> C e D; <i>C. botulinum</i> C e D
L4	T4	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> A,B,C e D; <i>C. haemolyticum</i>
L5	T5.1	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> B,C, e D
	T5.2	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> B,C e D, <i>C. botulinum</i> C e D
L6	T6	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> B e D
L7	T7	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> C e D
L8	T8	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> B; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> B, C e D
L9	T9	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> B, C e D
L10	T10	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> B; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> C e D
L11	T11	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> B; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i>
L12	T12 (C+)	Vacina importada
L13	T13 salina	

3.4-Meios de cultura

Na produção da toxina foi empregado o meio BHI (Infuso Cérebro e Coração, Difco Laboratories, Detroit, Mich.) suplementado com 0,05% de cisteína (Ballard et al., 1992). O meio BHI foi reconstituído de acordo com a recomendação do fabricante e a cisteína foi adicionada imediatamente antes da autoclavagem a 121°C, por 20 minutos. Para a produção de esporos foi utilizado o meio descrito por Kolbe et al. (1981). Para multiplicação das amostras e provas de esterilidade foi utilizado ágar sangue com 10% de sangue desfibrinado de carneiro.

3.5- Amostras de *Clostridium septicum*, toxina e antitoxinas

Para a produção das toxinas e suspensão de esporos foi utilizada amostra de *Clostridium septicum* (ATCC-12464) adquirida junto ao American Type Culture Collection (ATCC) dos Estados Unidos da América. Uma amostra de *Clostridium septicum*, fornecida por um laboratório produtor de vacina, foi avaliada para a produção de toxina. A antitoxina alfa de *Clostridium septicum* padrão, contendo 50 UI/mL, e a toxina alfa padrão, contendo 26 L+/5, originadas do National Institute Biological Standard and Control (NBISC-Inglaterra), foram gentilmente cedidas pelo LARA/MG.

3.5.1- Cultivo e manutenção das amostras

As amostras liofilizadas foram reconstituídas pela adição de 1 mL de meio BHI e semeadas em dois tubos (15x 160 mm) contendo 10mL de meio BHI e em duas placas de ágar sangue. Os tubos e uma placa foram incubados a 37°C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose (CO₂- 9,8%; H₂- 10,4%; N₂- 79,8%). A outra placa foi mantida em aerobiose em estufa a 37°C por 48 horas. As amostras foram avaliadas quanto a pureza pela coloração de Gram.

Para manutenção das amostras foram feitos inóculos (1/10) em cinco tubos contendo 9 mL de BHI e incubados a 37°C por 48 horas

em anaerobiose (9,8% CO₂; 10,4% H₂; 79,8% N₂). Os crescimentos obtidos foram centrifugados a 8000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em leite em pó a 10% e liofilizado segundo Rudge (1983).

3.5.2-Aquecimento das amostras

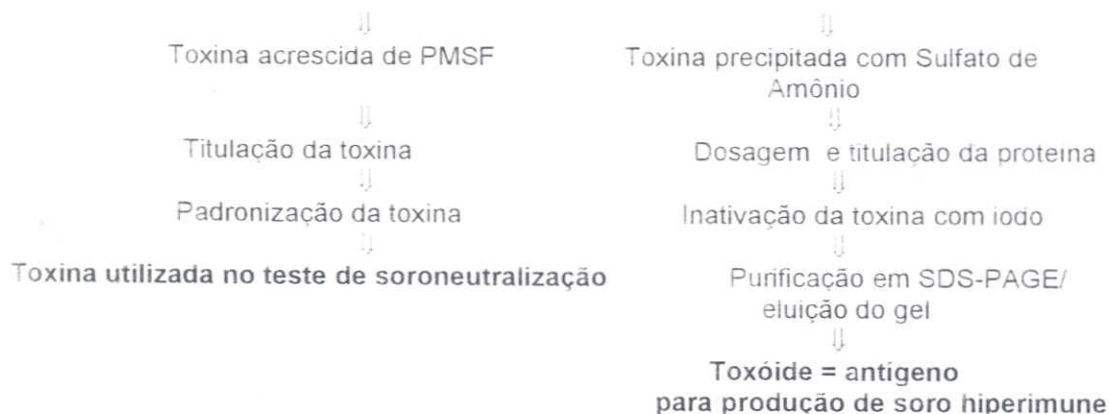
Com o objetivo de aumentar a toxigenicidade das amostras empregadas, elas foram passadas em cobaios inoculando-se 0,5 mL de uma mistura 1:2 de cultura de *Clostridium septicum* e solução de cloreto de cálcio a 5%. As amostras foram isoladas do sangue de cobaio obtido por punção cardíaca, no período pré-agônico.

3.5.3-Produção e concentração da toxina

Inóculos de colônias típicas obtidas no ágar sangue, confirmadas pela técnica de imunofluorescência direta, foram transferidos, na proporção de 1:100, para o meio de produção de toxina e incubadas em atmosfera de anaerobiose (9,8% CO₂; 10,4% H₂; 79,8% N₂) a 37°C por 24 horas (Ballard et al., 1992). Após crescimento, 1000 mL da cultura foi centrifugado a 7000 x g por 30 minutos e o sobrenadante concentrado 20 vezes em célula de ultrafiltração (AMICON INC. BEVERLY, MA 01915 USA), com membrana de retenção de 10 KDa até obter um volume final de 50 mL.

Várias frações de toxina concentrada foram estocadas a -80°C até obtenção de volume suficiente para realizar nova concentração. O volume final obtido, concentrado 80 vezes, foi fracionado em duas alíquotas. A uma delas foi adicionado inibidor de protease, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF-Sigma, P.O. Box 14508 St. Louis), na proporção de 10mM por litro. Esta toxina foi alíquotada em ependorf e mantida a -80°C e utilizada em testes de soroneutralização em camundongos. A outra alíquota foi precipitada com sulfato de amônio, detoxificada pelo método de iodação e purificada para ser utilizada como antígeno na produção de soro hiperimune.

Toxina concentrada 80 vezes (dividida em duas alíquotas)



3.5.4 – Confirmação do tipo de toxina utilizado

Para confirmação do tipo de toxina produzida por *Clostridium septicum*, foi empregada a metodologia descrita por Lobato (1989) com modificações que consiste na mistura de 1,0 mL toxina, em diferentes diluições, com 1,0 mL de antitoxina homóloga contendo 1,0 UI/mL. As misturas foram mantidas em banho-maria, a 37°C por 30 minutos e em seguida administrados 0,5 mL, por via endovenosa, em quatro camundongos e os animais foram observados por um período de 72 horas. Como controle positivo, foram inoculados camundongos somente com toxina na mesma dose e via de inoculação.

3.5.5-Titulação da toxina em camundongos

A titulação foi realizada de acordo com o descrito na Farmacopéia Européia (1998), empregando-se diluições decimais da toxina em tampão fosfato gelatina para a determinação da DL₅₀. Para cada diluição, inocularam-se cinco camundongos, pesando 17 a 22 g, com 0,5 mL por via endovenosa e os animais foram observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida uma vez e os resultados dos dois testes acumulados para efeito de cálculo da DL₅₀ (quantidade de toxina que inoculada por via endovenosa ou intraperitonal em camundongos causa a morte de metade dos

animais inoculados em 72 horas). Mortos e sobreviventes foram devidamente anotados. A DL₅₀ foi calculada pelo método de Reed e Muench (1938).

3.5.6-Padronização, determinação da dose teste da toxina

Para a determinação da dose teste da toxina a ser empregada na titulação do soro dos animais imunizados, empregou-se o nível de teste L+/5 (menor quantidade de toxina que, misturada com 0,2 UI de antitoxina padrão homóloga e inoculada em camundongos por via endovenosa, causa morte dos animais em 72 horas). A técnica empregada está de acordo com o descrito na Farmacopéia Européia (1998): diluições decimais da toxina em tampão fosfato gelatina foram homogeneizadas com antitoxina padrão homóloga e a mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Para cada diluição, 0,5 mL foram inoculados em cinco camundongos por via endovenosa. O teste foi repetido mais uma vez. Os resultados dos testes foram anotados e somados para efeito de cálculo realizado pelo método descrito por Reed e Muench (1938). A alfa toxina padronizada em L+/5 foi considerada adequada quando continha, no mínimo, 10DL₅₀/mL.

3.5.7- Precipitação da toxina com sulfato de amônio

A uma parte da toxina concentrada foi adicionado, lentamente e sob agitação a 4°C, igual volume de solução saturada de sulfato de amônio a 50%, pH 7.0. Após agitação por uma hora a 4°C, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 3000 x g, sob refrigeração, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em seu volume original com tampão fosfato e reprecipitado com solução saturada de sulfato de amônio (V/V) e centrifugado como já descrito. O sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 1/10 do seu volume original em salina tamponada fosfatada (PBS) 0,15 M, pH 7,2 e empacotado em membrana de diálise com 7/8 de polegadas, de diâmetro e 0,001 polegada de espessura. A toxina foi dialisada em um volume 400 vezes maior de PBS 0,15M pH 7,2, durante 12 horas, com troca do PBS a cada 2 horas, para a eliminação do sulfato de amônio. Para verificação da eliminação do sulfato de amônio residual, adicionou-se uma gota de PBS da diálise em 0,5 mL de solução de cloreto de bário acidificada (Warr, 1984) e realizou-se a clarificação através da centrifugação a 14000 x g por 15 minutos.

3.5.8-Dosagem de proteína

A dosagem de proteína após a precipitação com sulfato de amônio foi realizada de acordo com Layne e Peterson (1988). A leitura foi realizada empregando diluições da toxina 1/50 e 1/100. Cada uma das diluições foi submetida a leitura em UV a 260nm e 280nm e os resultados anotados. A concentração (mg/mL) foi obtida por: $(A_{260} \times 1,55) - (A_{280} \times 0,77) \times \text{fator de diluição}$.

3.5.9- Inativação da toxina

O toxóide foi preparado submetendo a toxina ao processo de iodação de acordo com Heineine e Heineine (1998).

3.5.10- Purificação da toxina pelo sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)

Proteínas foram separadas pelo SDS-PAGE como descrito por Laemmli (1970),

utilizando um gel de 12% de resolução. Um volume total de 5 mL de toxina iodada foi aplicado em uma única canaleta enquanto um marcador de peso molecular pre-corado foi aplicado para direcionar o ponto de corte do gel. A corrida do gel foi realizada com 200 volts e uma corrente de 50 μ A por 50 minutos (Biorad, Model No. Protean II cell). O controle do ponto de corte do gel para posterior eluição foi realizado através da aplicação de um marcador de peso molecular pre-corado de 27 a 180 KDa (Prestained SDS Molecular Weight Markers*). Fragmentos deste corte foram empacotados em membrana de diálise com poros 10 KDa e imersos em tampão de eletroforese para eluição da toxina. Para eluir a proteína do gel foi usado um Transfer (Sigma, chemical company), 500 volts, 50 μ A por 40 minutos, semelhante ao descrito por Leppard et al. (1983). Após esse período, o material da eluição retido na membrana de diálise foi coletado e a proteína dosada pelo método de Layne e Peterson (1988). Uma pequena alíquota foi cromatografada em gel SDS-PAGE confirmando a presença da toxina purificada. Fragmentos do gel foram coradas pela técnica do azul de Comassie para certificar a eluição da proteína.

3.6- Produção da suspensão de esporos

Na produção da suspensão de esporos foi empregado o método descrito por Kolbe et al. (1981), com algumas modificações.

3.6.1- Preparo do meio de Kolbe

Para o preparo do meio de Kolbe, 100 g de fígado bovino foram cortados em cubos de 2,0 x 2,0 x 2,0 cm e colocados em 200 mL de água destilada. A seguir foram adicionados 0,2 g de papaina dissolvida em 5,0 mL de água destilada e o pH acertado para 7,2 pela adição de hidróxido de sódio 1N. A mistura fígado/papaina 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 a temperatura ambiente. O sobrenadante foi clarificado, por passagem em papel de filtro, e ajustado para pH 7,3, com solução hidróxido de sódio a 1N. Para cada 100 mL de filtrado final foram acrescentados: tripticase, 4,0 g; ágar bacteriológico, 2,0 g; extrato de levedura, 1,0

g. O meio foi distribuído em frascos tipo erlenmeyer de 500mL, 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.

3.6.2-Cultivo da suspensão bacteriana

Os frascos autoclavados contendo os meios de cultura foram imediatamente colocados em jarra de anaerobiose preenchida com mistura gasosa (9,8% CO₂, 10,4% H₂, 79,8% N₂) e assim mantidos por 18 horas antes do inóculo. Cada frasco foi inoculado com 2,0 mL de uma cultura de 18 horas de *Clostridium septicum*, incubado a 37°C, em meio BHI. A cultura foi distribuída sobre o ágar com movimentos circulares de maneira a haver uma distribuição uniforme sobre a superfície, incubada em atmosfera de anaerobiose a 37°C, por 48 horas, e após esse período a 27°C, por mais 96 horas.

3.6.3-Coleta da suspensão bacteriana

Finalizado o período de incubação adicionaram-se ao frasco pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro e uma solução de tampão fosfato (0,05M KH₂PO₄ e Na H₂PO₄) pH 7,0, estéril. A suspensão bacteriana foi removida da superfície do meio sólido agitando-se o frasco com movimentos circulares. Um total de 50 mL de cultura foi coletado e transferido para um frasco tipo erlenmeyer com capacidade para 250 mL previamente autoclavado com 50 mL de glicerina e uma barra magnética. Após a homogeneização completa, a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 14 dias. A presença de esporos foi verificada através de coloração específica (Kolbe *et al.*, 1981).

3.6.4- Provas de pureza da suspensão de esporos

A suspensão de esporos glicerizada foi inoculada em placas de ágar sangue – 10% sangue desfibrinado de carneiro – em tubos contendo caldo BHI e incubados em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 72 horas (Smith, 1975).

3.6.5- Titulação da suspensão de esporos

A titulação da suspensão de esporos glicerizada foi realizada utilizando-se diluições decimais em salina tamponada a 1%, pH 7,0. A dose letal 50% DL₅₀ foi calculada pelo método de Reed e Muench (1938). Para cada diluição, foram inoculados cinco cobaios, pesando entre 250 g e 300 g, com 0,5 mL de suspensão contendo 0,25 mL de esporos e 0,25 mL de solução de cloreto de cálcio a 5%, por via intramuscular. Os animais foram observados por 72 horas. A titulação foi realizada mais uma vez e o resultado acumulado para efeito de cálculo.

3.7- Avaliação das vacinas

As vacinas foram testadas segundo metodologia recomendada pela Farmacopeia Européia (1998) para avaliação do toxóide e por United States Department of Agriculture Animal Plant Health Inspection Service (APHIS-USDA, 1976) para avaliação da bacterina.

As provas de inocuidade e esterilidade foram consideradas como existentes. Todas as vacinas comerciais que possuem em sua composição *Clostridium chauvoei* e *Clostridium botulinum* são submetidas a essas provas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento.

3.7.1- Esquema de vacinação e sangria de coelhos para avaliação do toxóide

Para cada vacina foram utilizados 10 coelhos, inoculados por via subcutânea, com metade da dose recomendada para bovinos. No grupo testemunha a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85% em substituição à vacina. Os animais receberam a primeira dose da vacina e da solução salina 0,85% no dia 0 e uma segunda dose no dia 21. Todos os animais foram sangrados 14 dias após a segunda vacinação. Os soros dos 10 animais de cada grupo foram misturados em partes iguais constituindo-se um "pool" representando cada vacina. Os soros foram estocados a -20°C até a realização dos testes.

3.7.2- Esquema de vacinação e desafio para avaliação de bacterina

Para cada vacina foram utilizados oito cobaias e no grupo testemunha com cinco cobaias a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85%. Os animais foram vacinados por via subcutânea com 1/5 da dose recomendada para bovinos. Foram feitas duas vacinações, sendo a primeira dose no dia 0 e a segunda no dia 21. No dia 31 os animais foram desafiados, através da inoculação por via intramuscular, com uma mistura de 0,5 mL de uma suspensão de esporos contendo 100 DL₅₀/mL e CaCl₂ a 5%. As cobaias inoculadas foram observadas durante 72 horas, registrando-se as mortes ocorridas (APHIS, 1976).

3.7.3- Esquema de vacinação de bovinos

Para avaliação da resposta à vacinação em bovinos. Os animais foram distribuídos ao acaso em 11 grupos de seis animais. No dia zero os animais referentes a 10 grupos foram vacinados com a dosagem e via de aplicação indicada pelos laboratórios produtores. Um grupo controle foi inoculado com 5 mL de salina a 0,85%. No dia 42 os animais receberam a segunda dose das respectivas vacinas e salina a 0,85%. Os animais foram sangrados nos dias 0 e 56 e os soros obtidos foram estocados a -20°C até a realização dos testes. Os 11 grupos foram mantidos em um pasto separado dos demais animais da fazenda. As vacinas codificadas como T₁₁ e T₁₂ não foram utilizadas.

3.8- Triagem dos soros

A triagem dos soros obtidos foi feita através do teste de soroproteção de acordo com Tammemagy e Grant (1967) em 'pool' para os coelhos e individualmente para os bovinos. Um mL de cada soro foi misturado com 20 DL₅₀/mL de alfa toxina de *Clostridium septicum*, homogeneizado e mantido em banho-maria 37°C por 30 minutos. Em seguida foram inoculados 0,5 mL, via endovenosa, em dois camundongos por soro. Uma suspensão de toxina com 20 DL₅₀/mL foi empregada como controle. Os camundongos foram observados por 72

horas, anotando-se os mortos e sobreviventes.

3.9- Titulação do soro dos coelhos e bovinos

Os soros positivos ao teste de soroproteção foram titulados pelo método de soroneutralização em camundongos e expressos em UI/mL.

3.10- Interpretação das provas

Avaliação do toxóide:

A vacina será considerada eficaz quando o título sorológico dos coelhos imunizados for igual ou superior a 2,5 UI/mL (Farmacopéia Européia, 1998).

Avaliação da bacterina:

A prova será considerada válida se, no mínimo, quatro das cinco testemunhas inoculadas morrerem;

A vacina será considerada eficaz se houver sobrevivência de sete dos oito animais vacinados (APHIS, 1976).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de *Clostridium septicum* aquecidas mostraram um bom crescimento quando inoculadas em meio BHI suplementado com L-cisteína (Ballard et al., 1992). *Clostridium septicum* (ATCC 12464) foi selecionado para a produção de toxina, observando menor tempo de morte dos camundongos após inoculação de 0,1mL de sobrenadante das culturas. Os títulos em dose mínima mortal (DMM) foram calculados em $1,0 \times 10^1$ e $1,0 \times 10^2$ DMM/mL, respectivamente, para a amostra de *Clostridium septicum* da indústria e para a amostra de *Clostridium septicum* (ATCC-12464).

O tipo de toxina foi confirmado através da sorotipagem de modo semelhante ao utilizado por Lobato (1989), uma vez que não foi detectada morte dos camundongos inoculados com a mistura de toxina e antitoxina homóloga. Animais inoculados com a toxina pura morreram dentro de 24 horas (Tab. 1).

Tabela 1 – Toxinotipia da amostra de *Clostridium septicum* usada no teste de vacina.

Diluição	Volume toxina	Volume soro (1,0 UI/mL)	M/S*
1/2	1,0 mL	1,0 mL	0/3
1/4	1,0 mL	1,0 mL	0/3
1/8	1,0 mL	1,0 mL	0/3
Pura	2,0 mL	-----	3/3

* Mortos/sobreviventes

Uma vez confirmado o tipo de toxina, três litros de cultura foram concentrados para 150 mL. As partidas de toxina, concentradas 20 vezes em célula de ultrafiltração, apresentaram uma média de títulos $1,2 \times 10^7$ antes e $1,2 \times 10^3$ DMM/mL após a concentração.

Dois meses após a produção inicial houve queda do título da toxina concentrada 20 vezes, o que fez questionar a sua estabilidade, embora ela estivesse sendo mantida a -80°C . Fato semelhante foi observado por Ballard et al. (1992), Cortinãs et al. (1997) e se explica, possivelmente, pela ação de proteases endógenas produzidas pelo *Clostridium septicum* que durante as etapas de separação, concentração e estocagem atuam sobre a toxina inativando-a.

Os títulos de filtrados de toxina, antes da concentração, obtidos neste trabalho, em DMM, estão abaixo dos títulos obtidos por Choman (1968); Choman (1969); Hnatkova (1986); e semelhantes aos obtidos por Claus e Kolbe (1979). Segundo Hauer* (*Paul J. Hauer, APHIS-USDA, comunicação pessoal) uma amostra de *Clostridium septicum* produtora de toxinas

deve apresentar títulos entre 200 a 500 DMM/mL.

Considerações sobre produção de toxina foram feitas por Lobato e Assis (1999) em relação à importância da amostra utilizada, meio de cultura, pH, temperatura e tempo de incubação; Cortinãs et al. (1997) observaram que, mesmo sendo mantidas as condições adequadas de cultivo, os títulos de toxina variavam a cada partida produzida.

Na seqüência da produção de toxina, 10 litros de sobrenadante foram concentrados, usando membranas com poros de 10KDa, ao volume de 120 ml. Este método consumiu tempo mas permitiu a obtenção de filtrados tóxicos com título suficiente para a realização dos testes de soroneutralização e produção de antígenos. Membranas com poros de 10 KDa, para a concentração de toxinas, foram também utilizadas por Ballard et al. (1992), Cortinãs et al. (1997), Amimoto et al. (2002).

A toxina concentrada foi dividida em duas alíquotas de 60 mililitros. A alíquota acrescida de PMSF, na proporção de 10mM (Ballard et al., 1993), foi titulada em DL_{50} , como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Titulação da toxina de *Clostridium septicum*, concentrada 80 vezes, acrescida de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).

Diluição	Nº animais inoculados	Dose inoculada	Mortos e Sobreviventes
1/64	10	0,5 mL	10/0
1/128	10	0,5 mL	10/0
1/256	10	0,5 mL	10/0
1/512	10	0,5 mL	10/0
1/1024	10	0,5 mL	6/4
1/2048	10	0,5 mL	0/10
1/4096	10	0,5 mL	0/10

A toxina concentrada 80 vezes, adicionada de PMSF, apresentou título de $2,29 \times 10^3$ DL₅₀/ mL. Esta toxina manteve-se estável por todo o período do experimento. Provavelmente esta estabilidade foi favorecida pelo acréscimo de PMSF.

A dose teste dessa toxina, determinada ao nível de L+/5, foi de 178,67 L+/5/mL. Cada L+/5 de alfa toxina continha 10,7 DL₅₀. O valor considerado apropriado para que uma toxina seja utilizada no teste de soroneutralização em camundongos é que cada L+/5 de alfa toxina contenha no mínimo 10 DL₅₀ (Farmacopéia Européia, 1998).

Utilizando níveis de teste L+/5, detectam-se níveis de antitoxina alfa de 2 UI/mL, pois a dose empregada na titulação de soros deve ser 10 vezes a dose teste calculada. Em todos os ensaios de controle do teste, a toxina frente à antitoxina padrão homóloga, apresentou resultado de 2,0 UI/mL, validando a dose teste empregada.

A outra alíquota de 60 mL da toxina concentrada 80 vezes, precipitada com solução saturada de sulfato de amônio a 50%, dialisada em tampão fosfato e clarificada, possuía 34,8 mg/mL e título calculado em DL₅₀, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Titulação da toxina de *Clostridium septicum* concentrada 80 x e precipitada com solução saturada de sulfato de amônio a 50%.

Diluição	Nº animais inoculados	Dose inoculada	M/S
1/64	10	0,5mL	10/0
1/128	10	0,5mL	10/0
1/256	10	0,5mL	10/0
1/512	10	0,5mL	10/0
1/1024	10	0,5mL	8/2
1/2048	10	0,5mL	0/10
1/4096	10	0,5mL	0/10

O cálculo final foi obtido de acordo com Reed e Muench (1938). A toxina precipitada com sulfato de amônio, usada na produção de antígenos para obtenção de soro hiperimune, apresentou título de 3×10^3 DL₅₀/ mL.

A detoxificação dessa toxina foi realizada segundo Heineine e Heineine (1998). A eficiência do processo foi confirmada pela sobrevivência, após 72 horas, de dois camundongos, inoculados por via endovenosa, com 0,5 ml da solução final, diluída 1/100.

Alíquotas de alfa toxina bruta (ATB), alfa toxina detoxificada (ATD), alfa toxina padrão (ATPa) foram cromatografadas pelo SDS-PAGE usando um gel de 12% de resolução. Alíquotas dessas amostras foram diluídas em tampão contendo 5% de β -mercaptoetanol e aquecidas a 100°C por 5 minutos e 16 μ L de cada amostra foi aplicado nas canaletas. O produto final obtido, corado pela prata, (Fig. 1) comparado com o marcador de peso molecular foi compatível com peso da toxina entre 42-49 KDa (Cortiñas et al., 1997; Ballard et al., 1992; Amimoto et al., 2002).

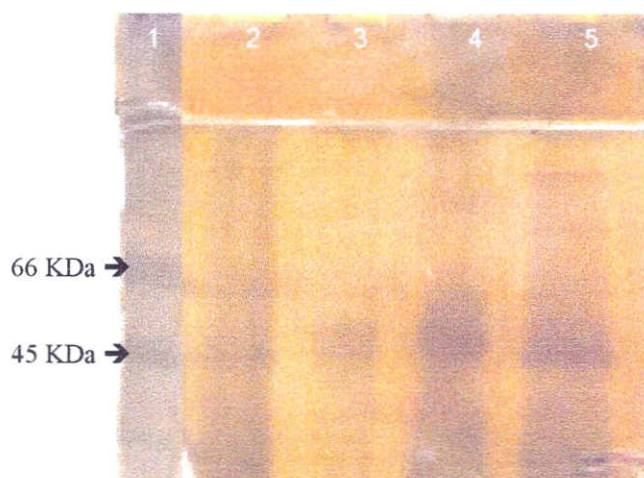


Figura 1 – SDS-PAGE corado pela prata. Canaleta 1-Marcador de peso molecular; 2-Toxina bruta iodada; 3- Toxina padrão; 4-Toxina bruta inativada com formol; 5- Toxina bruta iodada com tampão de redução

A suspensão de esporos de *Clostridium septicum* produzida no meio descrito por Kolbe et al. (1981) apresentou resultados satisfatórios confirmados por meio da técnica de coloração de esporos, evidenciando a presença maciça de esporos subterminais característicos do agente. O crescimento abundante de bactérias na superfície do meio pode ser explicado pelo contato restrito do meio com o ar evitando sua oxidação, resultado também encontrado por Neves (1997) e Balsamão (2001).

O crescimento bacteriano estava fortemente aderido à superfície do ágar, com a utilização de pérolas de vidro, foi possível sua total remoção. A suspensão de esporos, quando inoculada em meio BHI, ágar sangue e incubada em aerobiose, não apresentou nenhum crescimento. A suspensão de esporos foi titulada a partir da inoculação em cobaias e o título final foi de $10^{3,76}$ DL₅₀/mL. Para obtenção de 400 DL₅₀/mL utilizou-se a diluição 1:14,5.

Os resultados do teste de potência para bacterinas (APHIS, 1976) estão apresentados na Tabela 4. As vacinas codificadas como T₁, T₁₁ e T₁₂, por apresentarem proteção em três dos oito animais inoculados, foram retestadas. Os resultados indicam que nenhuma das 12 vacinas testadas atendeu aos requisitos mínimos no desafio com suspensão de

esporos. O uso de um grande número de animais, entretanto, torna este tipo de teste caro além de gerar questões bioéticas.

Tabela 4 – Teste de potência de vacinas comerciais contra clostridioses em cobaias vacinados e desafiados com suspensão de esporos de *Clostridium septicum*.

Vacina	Teste*	Repetição
T ₁	3/8	3/8
T ₂	0/8	
T ₃	0/8	
T ₄	0/8	
T _{5.1}	0/8	
T _{5.2}	0/8	
T ₆	0/8	
T ₇	0/8	
T ₈	0/8	
T ₉	0/8	
T ₁₀	3/8	3/8
T ₁₁	3/8	3/8

*Cobaias protegidas/cobaias desafiadas.

Na prova desafio foi utilizada a concentração final de 5% de CaCl₂, uma vez que Neves (1997) e Balsamão (2001) obtiveram resultados uniformes utilizando essa concentração.

A ausência de proteção em cobaias, ao desafio com suspensão de esporos, também foi observada por Lopes (1979),

Claus e Kolbe (1979), obtiveram proteção entre 0 e 100% quando empregaram no desafio uma amostra heteróloga de *Clostridium septicum*. Proteção acima de 90% dos animais foi observada por Choman (1969), Brown *et al.* (1976), Neves (1997), Amimoto *et al.* (2002).

O teste de triagem nos 'pools' de soros dos coelhos e no soro dos bovinos permitiu utilização de um menor número de camundongos, pois somente os soros aprovados no teste de soroproteção foram titulados através da soroneutralização. Esta medida vem adequar-se as exigências éticas.

Cada 'pool' de soros de coelhos, correspondente a uma vacina, foi desafiado com metade da dose recomendada pela Farmacopéia Européia (1998), 5DL₅₀. Dos treze 'pools' testados, somente cinco referentes às vacinas comerciais e um referente à vacina controle foram aprovados no teste de soroproteção.

Os soros onde ocorreu a sobrevivência dos camundongos foram considerados positivos e titulados em seguida. Os resultados do teste de potência dos imunógenos comerciais, expressos em UI/mL de antitoxina alfa de *Clostridium septicum* nos 'pools' dos soros de coelhos, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Títulos de antitoxinas alfa de *Clostridium septicum* em 'pools' de soros de coelhos coletados 35 dias após a primeira vacinação com imunógenos comerciais.

Vacina	Título
T ₁	5,0 UI/MI
T ₂	2,0 UI/mL
T ₃	NT ²
T ₄	2,5 UI/mL
T _{5.1}	NT
T _{5.2}	NT
T ₆	NT
T ₇	NT
T ₈	NT
T ₉	NT
T ₁₀	>5,0 UI/mL
T ₁₁	>5,0 UI/mL
T ₁₂ controle (+)	>5,0 UI/mL
T ₁₃ salina	NT

1 - Vacinados nos dias 0 e 21

2 - Não aprovados no teste de soroproteção
A avaliação de potência do soro foi realizada em uma única etapa, aos 35 dias da primeira imunização. O 'pool' de soros dos animais imunizados com a vacina T₁₂, controle do teste, apresentou resultados superiores a 5UI/mL de antitoxina alfa, resultado similar apresentado pelas vacinas T₁₀, T₁₁, enquanto T₁ apresentou título igual a 5 UI/mL e T₄ apresentou 2,5 UI/mL, título mínimo suficiente para ser aprovada. O nível de anticorpos detectado em T₂ foi inferior ao preconizado pela Farmacopéia Européia (1998), as demais vacinas não induziram resposta passível de detecção dentro do nível de teste empregado.

Os títulos obtidos para coelhos nas vacinas T₁, T₁₀, T₁₁ são superiores aos obtidos por Webster e Frank (1985), e por Frerichs e Gray (1975), em duas das vacinas testadas, porém esses títulos são inferiores aos obtidos por Sterne *et al.* (1962) e por Frerichs e Gray (1975) quando utilizaram óleo como adjuvante.

Embora ovelhas não tenham sido avaliadas neste trabalho, os resultados obtidos por Sterne *et al.* (1962), Hepple (1960), Webster e Frank (1985) são superiores ao preconizado, em coelhos, pela Farmacopéia Européia (1998), podendo vir a ser utilizado como um indicador da resposta.

De acordo com a Farmacopéia Européia (1998), o animal referência para teste de vacina é o coelho, entretanto, ao longo dos anos, tem-se tornado evidente que alguns componentes das vacinas polivalentes produzem respostas diferenciadas em algumas espécies animais (Sterne *et al.* 1962; Frerichs e Gray, 1975; Webster e Frank, 1985). Isto pode acarretar sérios prejuízos aos produtores que acreditam realizar imunização efetiva em seus rebanhos.

Na avaliação da vacinação dos bovinos, foi verificado que das 10 vacinas testadas somente quatro foram aprovadas no teste de soroproteção. Os soros dos animais, selecionados pela soroproteção, foram titulados através da prova de soroneutralização em camundongos e os resultados demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium septicum* em soros de bovinos¹ coletados 56 dias após a primeira vacinação com imunógenos comerciais.

Vacinas							
T ₁		T ₂		T ₄		T ₁₀	
Soro	Título	Soro	Título	Soro	Título	Soro	Título
A ₁	>5UI/mL	B ₁	NT ²	C ₁	>5UI/mL	D ₁	>5UI/mL
A ₂	>5UI/mL	B ₂	NT	C ₂	NT	D ₂	NT
A ₃	>5UI/mL	B ₃	>1UI/mL	C ₃	>5UI/mL	D ₃	NT
A ₄	NT	B ₄	>5UI/mL	C ₄	>5UI/mL	D ₄	>5UI/mL
A ₅	>5UI/mL	B ₅	NT	C ₅	NT	D ₅	NT
A ₆	NT	B ₆	>5UI/mL	C ₆	>5UI/mL	D ₆	>5UI/mL

1 - Vacinados nos dias 0 e 42

2 - Não aprovados no teste de soroproteção

Diferenças nas respostas entre os animais do mesmo grupo foram observadas com as quatro vacinas tituladas. Variações de respostas vacinais, entre animais de uma mesma espécie, foram também relatadas por Sterne et al. (1962). Esta diferença de resposta detectada entre animais de um mesmo grupo pode ser devido a variáveis não controladas no experimento como características individuais, acesso e ingestão de alimento, resposta a infestação parasitária, entre outros.

O resultado da avaliação em bovinos é semelhante ao resultado obtido em coelhos em relação às vacinas T₁, T₄ e T₁₀. A diferença de resultados em relação as duas espécies foi verificada com a vacina T₂. Das doze vacinas testadas somente quatro alcançaram os níveis mínimos exigidos para a aprovação como preconizado pela Farmacopéia Européia (1998).

O tratamento da Gangrena gasosa ou Edema maligno é impraticável considerando o efeito da toxina sobre o organismo. O animal, na maioria das vezes, é encontrado morto ou em estado agonizante. A utilização de imunógenos tem reduzido a mortalidade e as perdas econômicas relacionadas as clostridioses.

O controle oficial de vacinas contra o Carbúnculo Sintomático implantado em 1986, no Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/RS e das vacinas contra o

botulismo em 1994, no Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MG – Ministério da Agricultura e Pecuária -MAPA, garantiu a qualidade desses produtos no mercado. A ausência de um controle oficial e de legislação específica para vacinas contra *Clostridium septicum* não isenta a responsabilidade do Laboratório fabricante pela qualidade de seus produtos, conforme previsto na Lei 8.078 (Brasil, 1990), consagrada como Código de Defesa do Consumidor e na Portaria 301 do MAPA que em seu artigo 21 exige que toda partida de produto biológico, antes da comercialização, deverá ser submetida, conforme o caso, aos seguintes controles: esterilidade, pureza, inocuidade, eficácia, sorologia, potência/imunogenicidade.

Os resultados deste estudo somando-se aos verificados por Azevedo et al. (1998), Lobato (1989), Lobato et al. (2000), Balsamão (2001), demonstraram que, em sua maioria, as vacinas clostridiais comercializadas no Brasil não induzem respostas imunológicas suficientes para a proteção dos animais, evidenciando a necessidade da implementação de um controle efetivo destes imunógenos.

5- CONCLUSÃO

As vacinas contra clostridioses que contêm em sua composição *Clostridium septicum*, comercializadas no Brasil, em sua maioria, foram ineficientes para induzir resposta imunológica compatível com o nível mínimo de teste recomendado para controle deste produto.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AMIMOTO, K. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccine against challenge with spores guinea pigs *J. Vet. Med. Sci.* v.64, n.1, p.67-69, 2002.
2. APHIS-USDA. Anon: Developmental assay method for potency assay of *Clostridium septicum*-containing products. USDA, Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, 1976.
3. ASSIS, R. A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E.; et al. An outbreak of malignant edema in cattle. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* v.97, n.543, p.143-145, 2002.
4. AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V. L.V. et al. Avaliação de vacinas contra o *Clostridium perfringens* tipo C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.50, n.3, p.239-242, 1998.
5. BALLARD, J. et al. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol. Microbiol.* v. 10, n.3 p.627-634, 1993.
6. BALLARD, J. et al. The Primary structure of *Clostridium septicum* alpha-toxin exhibits similarity with that of *Aeromonas hydrophila* aerolysin. *Infect. Immunol.* v.63, n.1, 1995.
7. BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D.; TWETEN, R.K. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect. Immunol.* v. 60, p.784-790, 1992.
8. BALSAMÃO, G. M. *Teste de potência para Clostridium de sordellii em vacinas comerciais contra clostridioses.* Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. Dissertação Mestrado, Medicina Veterinária Preventiva.
9. BERNHEIMER, A. W. Parallelism in the lethal and hemolytic activity of the toxin of *Clostridium septicum*. *J. Exp. Med* v.80, p.309-320, 1944.
10. BRASIL. Lei nº. 8.078, 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de setembro de 1990. Suplemento n.º 176.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 301, 92 de abril de 1996. *Diário Oficial da União*. Brasília, 25 de abril de 1996. Seção 1, p.7013-7018.
12. BROWN, K.K.; PARIZEK, R.E.; STTEWART, R.C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with multivalent bacterin-toxoid. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.71, n.12, p.1717-1722, 1976.
13. CHOMAN, B.R. COOPER, M.S.; MARTINI, B.S. Direct challenge potency test for bacterins containing *Clostridium septicum*. *Am. J. Vet. Res.* v.29, n.3, p.679-683, 1968.
14. CHOMAN, B.R. Sequential growth of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, and *Clostridium novyi* in same medium *Am. J. Vet. Res.*, v.30, n.1, 1969.
15. CLAUS, K.D.; KOLBE, D.R. Immunogenicity of *Clostridium septicum* in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, n.12, p.1752-1756, 1979.
16. CORTIÑAS, T.I., MATTAR, M.A. GUSMÁN, A.M.S. Alpha-toxin production by *Clostridium septicum* at different culture conditions. *Anaerobe*, v.3, p.199-202, 1997.
17. 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.

18. GORDON, V.M. *et. al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by fenn *Infect. Immunol.* v. 65, n. 10, p.4130-4134, 1997.
19. GYLES, C. L. Histotoxic clostridia. *In:* GYLES, C.L.; THJOEN, C. O. (Eds) *Clostridia 2* Ed Ames: Iowa State University Press, 1993, p.106-113.
20. HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
21. HENDERSON, DW. Experiments with the "O" antigen of *Clostridium oedematiens maligni* (Vibron septique). *Brit. J. Exp. Pathol.*, v.15, n.3, p.166-175, 1934.
22. HENEINE, I.F., HENEINE, L.G. Stepwise iodation. A general procedure for detoxificação of proteins suitable for vaccine development and antiserum production. *Biologicals*, v.26, p.2532, 1998.
23. HEPPLER, J.R. Simultaneous Vaccination of sheep against pulpy kidney disease, braxy, blackleg and tetanus. *Vet. Rec.*, v.72, n.37, p.766, 1960.
24. HNÁTKOVÁ, Z. *et al.* Preparation of *Clostridium septicum* antigen for hyperimmunization of horses using a dialyzed culture. *Folia Microbiol.*, v.31 p.382-386, 1986.
25. KERRY J. B.; CRAIG, G. R. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines *Vet. Rec.*, v.105, p.551-554, 1979.
26. KOLB, D.R.; CLAUS, K. D.; NERVIG, R. M, A method for the production of *Clostridium haemolyticum* spores on solid medium. *J. Biol. Stand.*, v.9, n.6, p.115-119, 1981
27. LAEMMLI, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* v.227, p.680-685, 1970.
28. LAYNE, E.; PETERSON, GL Protein quantitation- UV detection. *In:* HARLOW, E. LANE, D. (Eds.). *Antibody a laboratory manual*. New York: Cold Spring Verlag, 1988, p. 673.
29. LEPPARD, K. N. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *In:* HARLOW, E.; LANE, D. (Eds.). *Antibody a laboratory manual*. New York: Cold Spring Verlag, 1988, p. 636-639.
30. LOBATO F C F; *et al.* Avaliação da resposta de antitoxinas beta e epsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.4, p.313-318, 2000.
31. LOBATO, F. C. F. *Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil*. Belo Horizonte: Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1989. 59f, Dissertação de Mestrado.
32. LOBATO, F. C. F. Isolamento e caracterização de amostras do *Clostridium botulinum* tipos C e D no Brasil. Belo Horizonte: Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997. 113p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal).
33. LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. Diagnóstico de clostridioses e controle de qualidade das vacinas. *In:* Anais do V Simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. Anais do IV CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. Campo Grande, 1999.
34. LOPES, A. A. *Avaliação de imunógenos anti-carbúnculo sintomático em uso no Brasil*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1977. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
35. MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Path. Bact.*, v.77, n.2, p.341-350, 1959.

36. NEVES R. D. *Aplicação de um método de produção de esporos de Clostridium haemolyticum na eficácia da vacina contra hemoglobínúria bacilar*. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 65f. (Mestrado em Ciências Veterinárias).
37. PREVOT, A. R. *Biologia des maladies dues aux anaérobies*. Paris: Flammarion, 1955. 155.p.
38. REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.
39. ROBERTSON, M., FELIX, A. Serological groupings of *Vibrio Septique* and their relation to the production of toxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, v.23, n.2, p.153-170, 1920.
40. ROTH, F; JANSEN, K; PETZKE S. Detection of neutralizing antibodies against α -toxin of different *Clostridium septicum* strains in cell culture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* v.24, p.353-359, 1999.
41. RUDGE, R.H. *Maintenance of microorganism: a manual of laboratory methods*. London: J. J.S. Snell, 1983. Cap.4: Maintenance of bacteria by freeze-drying, p.23-34.
42. SMITH, L. D. *The pathogenic anerobic bacteria*. 2 ed. Illinois: Charles C. Thomas, 1975. Cap. 13: *Clostridium spp*, p.271-280.
43. SMITH, L. D.; WILLIAMS, B.L. *Clostridium septicum* In: A. Balows (ed.), *The pathogenic anaerobic bacteria*. 3 ed. Charles C. Thomas: Springfield, 1984. p.180-190.
44. STERNE, M; BATTY, I. THOMSON, A. et al. Immunization of sheep with multi-component clostridial vaccines. *Vet. Rec.*, v. 74, n.34, p. 909-913, 1962.
45. TAMMEMAGY, L.; GRANT, K.M. Vaccination in the control bovine botulism in Quesland. *Aust. Vet. J.*, v. 43, n.9, p. 368-373, 1967.
46. TWETEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet. Microbiol.*, V.82, n.1, 2001.
47. VETERINARY Vaccines in: British Pharmacopoeia. Department of Health and Social Security, Medicines Commission. Reino Unido, 1985.
48. VETERINARY vaccines. *Clostridium septicemia* vaccine in: European Pharmacopeia. 3 ed. Saint Ruffine: Maisonneuve S.A., p.151-152, 1998.
49. WARR, G.W. Purification of antibodies. In: MARCHALONIS, J.J. WARR, G.W. *Antibody as a tool: the applications of immunochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 1984. p.59-96.
50. 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, 1985.
51. WILSON, L. M.; MACFARLANE, G. T. Cytotoxicity, adhesion and invasion of *Clostridium septicum* in cultured human epithelial cells (CACO-2, Hep-2): pathological significance of swarm cell differentiation. *Anaerobe* v.2. p. 71-79, 1996.