

T636.039 69

M244a

2003



Ricardo Aurélio Pinto Nascimento

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE VACINAS CONTRA
Clostridium novyi tipo B**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA
2003



140503

1517103-05

0849-88860

N244a Nascimento, Ricardo Aurélio Pinto, 1962-
Avaliação da eficiência de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B /
Ricardo Aurélio Pinto Nascimento. – 2003.
34p. :il.

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


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

CDD – 636.089 537 2

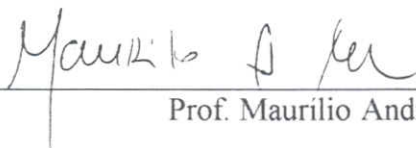
Dissertação defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2003, pela Comissão Examinadora constituída por:



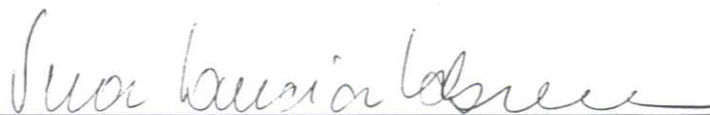
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Orientador



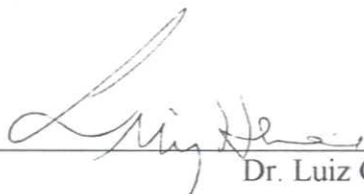
Prof. Andrey Pereira Lage



Prof. Maurilio Andrade Rocha



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

*Este trabalho é dedicado a todos
aqueles que mantêm em seu espírito
a firme determinação pela constante
busca da verdade!*

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Professor Francisco Lobato pela amizade, incentivo e constante presença em minha atuação profissional.

À Professora Vera Viegas pelo grande apoio, valorização profissional e incentivo para cursar o Mestrado.

A todos os amigos do LARA MG que souberam compreender o meu temporário afastamento na busca por condições mais justas e fraternas, pela amizade e apoio.

Aos colegas do Ministério da Agricultura, Ronaldo e Roger/ LARA RS e Antônio Araújo CPV DF, pela incansável disposição e busca constante de produtos veterinários biológicos de qualidade adequada.

Aos companheiros da EV/UFMG, Nelson Éder, Ronnie Assis, Liliane Dias, Clara Nilce, Augusto, Luciana e Guilherme pela irrestrita ajuda, apoio e saudável convivência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	8
1	INTRODUÇÃO	10
2	LITERATURA CONSULTADA	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Local de realização do experimento	16
3.2	Aquisição das vacinas.....	16
3.3	Animais.....	16
3.4	Amostras de <i>Clostridium novyi</i> tipo B utilizadas.....	17
3.5	Meios de Cultura.....	17
3.6	Cultivo da amostras	17
3.7	Manutenção das amostras	17
3.8	Toxinas	17
3.8.1	Seleção da amostra	17
3.8.2	Avaliação de meios para produção de toxina.....	17
3.8.3	Titulação da toxina	18
3.8.4	Toxinotipia	18
3.9	Dosagem protéica.....	19
3.10	Manutenção da toxina.....	19
3.11	Padronização da toxina.....	19
3.12	Produção de esporos	19
3.12.1	Preparação dos meios de cultura	19
3.12.2	Cultivo da suspensão bacteriana.....	19
3.12.3	Coleta da suspensão bacteriana	20
3.12.4	Provas de Pureza	20
3.12.5	Titulação da suspensão de esporos	20
3.12.6	Controle	20
3.12.7	Manutenção da suspensão de esporos	20
3.13	Teste de eficiência das vacinas.....	20
3.13.1	Esterilidade	20
3.13.2	Inocuidade	20
3.13.3	Esquema de vacinação, coleta de soro e desafio	20

3.14	Provas sorológicas.....	21
3.14.1	Soroproteção	21
3.14.2	Soroneutralização	21
3.14.3	Interpretação do Teste de Eficiência	22
3.15	Interpretação da prova de desafio direto em cobaios.....	22
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	22
5	CONCLUSÕES	29
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

7 **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Codificação de laboratórios, vacinas, controles, composição antigênica das vacinas avaliadas e controles utilizados.	16
Tabela 2	Título em dose Mínima Mortal por mililitro das diferentes amostras de alfa toxina de <i>Clostridium novyi</i> tipo B, em Cooked Meat Medium	22
Tabela 3	Título em dose Mínima Mortal por mililitro com diferentes meios para produção de alfa toxina pelo <i>Clostridium novyi</i> tipo B (ATCC 25758), pela via intramuscular e via endovenosa.....	23
Tabela 4	Título em Dose Mínima Mortal por mililitro de alfa toxina produzida com diferentes amostras de <i>Clostridium novyi</i> tipo B, utilizando-se meio de Cardella (1958).	23
Tabela 5	Título em Dose Mínima Mortal por mililitro de alfa toxina de <i>Clostridium novyi</i> tipo B (ATCC 25758), estocadas a + 4°C e - 70°C, avaliados durante seis meses, após concentração.....	24
Tabela 6	Título em Dose Letal 50 % por mililitro da suspensão de esporos produzida e do padrão APHIS/EUA, IRP 307, de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em cobaias inoculadas por via intramuscular	24
Tabela 7	Teste de eficiência de vacinas contra clostridioses, contendo em sua composição <i>Clostridium novyi</i> tipo B, em cobaios vacinados e desafiados com suspensão de esporos por via intramuscular	25
Tabela 8	Soroproteção em camundongos frente a 2,5 Dose Letal 50% de alfa toxina de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em "pool" de soros de coelhos vacinados nos dias 0 e 21, e sangrados no dia 35.....	26
Tabela 9	Títulos de antitoxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B nas misturas dos soros de coelhos, vacinados com imunógenos comerciais e toxóide padrão.	26
Tabela 10	Título de antitoxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B nos soros de bovinos coletados no dia 56.	27
ANEXOS		33
Anexo I	Protocolo de Titulação da alfa toxina.....	33
Anexo II	Protocolo de Padronização da alfa toxina.....	33

RESUMO

Foram avaliadas, quanto à eficiência, treze vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *Clostridium novyi* tipo B. Pelo teste de desafio direto em cobaias, pela titulação de antitoxina alfa em soros de coelhos e bovinos. Em coelhos, as vacinas codificadas como T1 e T10 apresentaram títulos de antitoxina alfa de 8 UI/mL e 12 UI/mL, respectivamente, superiores ao nível mínimo exigido nas normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 3,5 UI/mL para a alfa anti-toxina. As vacinas T2 e T5 apresentaram título de 2 UI/mL e 3 UI/mL, respectivamente. As vacinas T1, T2, T5 e T10, apresentaram níveis de antitoxina alfa detectáveis em bovinos, mas somente as vacinas T1 e T10 induziram títulos compatíveis com o nível de teste. Pelo método de desafio direto em cobaias, as vacinas codificadas como T1, T2, T5, T10 e T11 atenderam aos requisitos protegendo todos os animais inoculados. Como controle do teste empregou-se toxóide e bacterina padrões. Em sua maioria as vacinas, comercializadas no Brasil contra *Clostridium novyi* tipo B, foram ineficientes em estimular níveis sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado para controle deste produto.

Palavras-chave: Vacina, Toxina, *Clostridium novyi* tipo B, Hepatite Necrótica Infecciosa, clostridioses, *Clostridium*.

ABSTRACT

The antibody response to the *Clostridium novyi* type B alfa toxin component of thirteen commercial vaccines (T1 to T13) and a standard toxoid was evaluated by the serum neutralization test with rabbit and bovine sera and by direct challenge of vaccinated guinea pigs. T1, T10 and the standard toxoid induced titles of *C. novyi* type B alfa antitoxin in rabbit superior to the recommended minimum title of 3,5 IU/mL, namely of 8 IU/mL, 12 IU/mL and 15 IU/mL, respectively. T2 and T5 induced titles of 2 IU/mL and 3 IU/mL, respectively. These, plus T1 and T10, were also the only vaccines which produced detectable antitoxin in bovine sera. The same group, plus T11, were able to protect all the vaccinated guinea pigs at the challenge. The majority of the *C. novyi* type B vaccines in commerce in Brazil were unable to induce the minimum antibody response recommended for approval of the product.

Keywords: Vaccine, toxin, *Clostridium novyi* type B, Infectious Necrotic Hepatitis, clostridiosis, *Clostridium*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection

APHIS - Agriculture Animal Plant Health Inspection Service, EUA.

CFR - Code of Federal Regulations

CU – unidade citotóxica

Dose letal 50% – DL_{50} , menor quantidade de toxina que provoca a morte em 50% dos animais inoculados em até 72 horas pós-inoculação.

Dose mínima mortal – DMM, menor quantidade de toxina que provoca a morte de 80% dos animais inoculados em até 72 horas pós-inoculação.

IRP – Internal Reference Protocol.

L+/100, menor quantidade de toxina capaz de provocar a morte em no mínimo 80% dos camundongos quando misturada a um soro padrão com 0,1 UI/mL.

SINDAM - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Veterinários

UI/mL – Unidades Internacional por mililitro.

1 - INTRODUÇÃO

Clostridium novyi tipo B faz parte do quadro dos agentes etiológicos responsáveis pelas clostridioses, estando geralmente associado à morte súbita e ao quadro de hepatite necrótica. Como é habitual de todo *Clostridia*, este agente é ubiqüitário, tendo a propriedade de permanecer por longo período de tempo no solo em forma de esporos, que ao encontrar condições favoráveis, proliferam-se rapidamente, produzindo toxinas.

A hepatite necrótica infecciosa está associada a trematódeos hepáticos, como larvas de *Fasciola hepatica*. É uma doença infecciosa hiperaguda que afeta ovino, e por vezes bovinos. Tal enfermidade pode ocorrer potencialmente em eqüinos e caprinos, se estiverem presentes trematódeos hepáticos. As bactérias se multiplicam em áreas lesionadas do fígado, causadas pela migração dos trematódeos, produzindo poderosa toxina necrosante. *Clostridium novyi* geralmente é encontrado no trato alimentar dos ruminantes e em pastagens irrigadas, podendo ser disseminado por pássaros, animais silvestres, ou inundações.

A doença é de distribuição mundial e os prejuízos econômicos advindos desta enfermidade são difíceis de serem avaliados, faltam dados epidemiológicos para isto, porém esses devem ser elevados uma vez que a evolução da doença é rápida, o que dificulta qualquer ação terapêutica.

O controle e a profilaxia devem basear-se em medidas adequadas de manejo e principalmente na vacinação de todo o rebanho com imunógenos eficientes, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear a enfermidade.

No Brasil, foram produzidas, na década de 90, um bilhão cento e noventa e três milhões de doses de vacinas contra clostridioses. No entanto, a qualidade e eficácia destas vacinas tem sido

questionadas em diversos trabalhos de pesquisas realizados no país.

Das vacinas contra clostridioses, apenas *Clostridium chauvoei* é controlada oficialmente pelo Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Porto Alegre (LARA/RS), e as vacinas contra o Botulismo, que são controladas pelo Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Pedro Leopoldo (LARA/MG).

Diante de uma produção significativa de vacinas, da inexistência de controle oficial que ateste a qualidade das mesmas e da importância da doença, faz-se necessário um controle severo na produção visando uma melhor qualidade destes imunobiológicos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de vacinas polivalentes contra clostridioses, que continham em sua composição *Clostridium novyi* tipo B, disponíveis para comercialização no mercado brasileiro.

2 - LITERATURA CONSULTADA

Clostridium novyi tipo B, descrito por Novy em 1894, é um bacilo gram-positivo em culturas jovens podendo apresentar-se gram-negativo em culturas velhas, é anaeróbio, móvel. Seu tamanho pode variar de 1,1-2,5 μm x 3,3-22,5 μm . Fermenta a glicose e liquefaz a gelatina, possui ação proteolítica variável. É indol positivo. Produz ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico e outros produtos metabólicos. A bactéria é sensível ao oxigênio, necessitando de meios pré-reduzidos e estrita condições de anaerobiose para o seu crescimento, (Hatheway, 1990).

A divisão do *Clostridium novyi* nos tipos A, B, C está relacionada à presença ou ausência da toxina letal alfa e de lecitinas gama e beta. A seguir estão relacionados os tipos de *Clostridium novyi* e os fatores

biologicamente ativos que produzem, (Sterne & Batty, 1978):

Tipo A: agente responsável pela Gangrena Gasosa humana. Produz alfa toxina com atividade letal necrosante, gama toxina com atividade lecitinásica hemolítica necrosante, delta toxina oxigênio-lábil com atividade hemolisina e epsilon toxina com atividade lipásica.

Tipo B: agente responsável pela Hepatite Necrótica Infecciosa em ovelhas e bovinos, podendo estar relacionado à gangrena gasosa humana. Produz alfa toxina com atividade letal necrosante. Pode produzir em menor quantidade beta toxina com atividade hemolítica necrosante letal. A ação da alfa toxina ocorre sobre os vasos sangüíneos provocando um aumento da permeabilidade vascular.

A alfa toxina apresenta peso molecular elevado 250 KDa, sendo considerada como pertencente à família das grandes toxinas, (Eichel-Streiber et al., 1996).

A atividade citotóxica da alfa toxina ocorre com uma dose de 64.000 CU/mL. A dose mínima mortal, determinada por inoculação em camundongos é de 320 DMM/mL, (Amimoto et al., 1998).

Tipo C: agente responsável pela Osteomielite em búfalos na Indonésia. Produz gama toxina com atividade lecitinásica hemolítica necrosante.

Ball et al. (1993) purificou e caracterizou a alfa toxina produzida por *Clostridium novyi* por cromatografia, obtendo um alto título em dose mínima letal, determinada em camundongo, de 5 a 10 ng. É uma toxina estável mantendo-se sua atividade quanto estocada a + 4°C.

Clostridium novyi tipo B é o agente etiológico da hepatite necrótica, também conhecida como moléstia negra. Provoca uma bacteremia e toxemia com complicações enterotóxicas. Nas regiões em que é endêmico pode estar presente no fígado de grande parte das ovelhas, sem manifestar sinais de alterações clínicas. A

migração da larva de *Fasciola hepatica* pode provocar lesões focais no fígado, nas quais o *Clostridium novyi* tipo B poderá multiplicar-se, produzindo alfa toxina, levando a áreas de necrose. Dissemina-se, causando bacteremia e toxemia. O aspecto característico dos tecidos, escuros e sanguinolento, é a razão do nome moléstia negra ou hepatite necrótica infecciosa. *Clostridium novyi* tipo B havia sido ignorado no passado pelo seu difícil crescimento e isolamento, sendo difícil sua confirmação bacteriológica. Na área da lesão produz pouco gás. Aparece uma zona edematosa extensa e a drenagem das feridas pode ser encontrada grande quantidade de fluidos orgânicos. (Sterne & Batty, 1978).

A doença apresenta-se em ovinos, bovinos e suínos. Ocorrendo principalmente em ovinos, a maior incidência é no período do verão e outono. Sua freqüência está relacionada à presença do *Clostridium novyi* tipo B no solo. (Smith, 1984).

Baldassi (1986), no Brasil, isolou bactérias do gênero *Clostridium* e de 118 amostras analisadas seis foram classificadas como *Clostridium novyi*, por provas bioquímicas, sem determinação do tipo envolvido.

Sweeney & Greig (1986), na Austrália, relatam um caso de hepatite necrótica infecciosa ocorrido em um equino, que estava no mesmo ambiente de ovelhas. Os sintomas relatados foram severo quadro de depressão, temperatura retal de 38,8°C, freqüência cardíaca de 65 batimentos por minuto, taquipnéia com 50 movimentos/minuto, mucosas ictericas. O animal morreu 72 horas após os primeiros sinais. Na necropsia foi verificada grande quantidade de líquido sanguinolento na cavidade peritoneal, o fígado apresentava áreas de necrose com 1-2 cm de diâmetro. Preparados destas áreas de necrose revelaram grande número de *Clostridium*, confirmado como *Clostridium novyi* tipo B pela técnica de imunofluorescência.

Oaks et al. (1997), nos Estados Unidos da América, relataram a ocorrência de dois casos de hepatite necrótica infecciosa, em equinos, suspeitos de infecção por

Clostridium, pela técnica de imunofluorescência, sem contudo, diferenciar o agente entre *Clostridium novyi* tipo B e *Clostridium haemolyticum*.

Duran & Walton (1997), nos Estados Unidos da América, estudaram 70 casos patológicos de suspeita de envolvimento de clostridioses em suínos, isolando *Clostridium novyi* tipo B em cinco casos, identificados pela técnica de imunofluorescência.

Uzal et al. (1997), na Argentina, diagnosticaram, pela técnica de imunofluorescência, um surto de hepatite necrótica, em quatro ovinos, onde a lesão do fígado para ação do *Clostridium novyi* tipo B pode ter sido ocasionada pelo uso de quimioterápicos.

Robles et al. (2000), na Argentina, relatam um surto de hepatite infecciosa necrótica, com identificação de *Clostridium novyi* tipo B pela técnica de imunofluorescência, com morte de 80 ovelhas em um rebanho com 1200 animais que apresentavam um severo parasitismo por *Thysanosoma actinioides*, conhecido, na Argentina, como "tenia festoneada", como provável fator desencadeante da hepatite necrótica.

Outros métodos de detecção de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B têm sido estudados, como testes in vitro por ação da alfa toxina em culturas de células. (Bormann & Schulze, 1999).

A técnica de ELISA foi estudada por Pietrzykowski et al. (1991), como técnica para detecção de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B. Utilizaram, no experimento alfa toxina concentrada, por ultrafiltração em membrana de corte de 100 KDa. Nos testes do experimento conseguiram detectar 2 ng de toxina/mL.

A concentração de toxinas produzidas tem sido utilizada como recurso para aumentar os títulos nos diversos processos de produção e para facilitar a purificação. Dentre os procedimentos para purificar a toxina a precipitação com sulfato de amônio em diversas concentrações tem sido

utilizada. Cerca de 80% da atividade tóxica pode ser recuperada quando precipitada com solução de 30–50% de sulfato de amônio. (Jansen, 1961).

Os tipos de toxinas produzidas podem ser confirmados pela técnica de toxinotípi, que relaciona toxina e antitoxina homóloga, utilizando-se bioensaio em camundongo, os animais deverão permanecer vivos para confirmação do tipo de toxina analisado. (Batty & Glenny, 1947).

A prevenção das clostridioses, através da administração de vacinas, é de uso rotineiro. O seu uso, dentro de um esquema de vacinação correto é um instrumento para a prevenção da mortalidade ocasionada por estas enfermidades. A utilização sistemática de imunógenos tem reduzido em grande parte a mortalidade e as perdas econômicas advindas de quadros clínicos causados pela multiplicação ou pela ação das toxinas produzidas pelos microorganismos do gênero *Clostridium*, os quais são patogênicos para os ruminantes domésticos. (Assis et al., 2001).

Macheak et al. (1972) avaliaram a potência de bacterinas com *Clostridium novyi* tipo B em sua composição comparando a resposta imune em cobaias e em carneiros. Determinaram títulos protetores de alfa antitoxina, com o mínimo de 8 UI/mL em cobaias, e de 1,6 UI/mL, em carneiros.

Brown et al. (1976) estudaram a prevenção de clostridioses em bovinos, carneiros e cobaias através da vacinação com uma bacterina-toxóide, composta por *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* e *Clostridium sordellii* obtendo resultado satisfatório para a vacina avaliada: 100% de proteção dos animais vacinados contra desafio de suspensão de esporos dos agentes acima relacionados.

Kerry & Graig (1979) estudaram, em carneiros, o efeito de vacinas com multicomponentes contra clostridioses, obtendo 97% dos animais, vacinados com uma dose inicial de 5 mL, seguida de uma dose reforço de 2 mL, com títulos de alfa antitoxina de *Clostridium novyi* tipo B

superiores a 5 UI/mL, apresentando melhor resultado comparado a duas doses de 2 mL, quando obteve 93% dos animais com títulos inferiores a 5 UI/mL.

Ardehali et al. (1984) estudaram um método para produção e padronização de vacina contra *Clostridium novyi* tipo B utilizando como método de controle para a vacina as recomendações da British Pharmacopeia, 1977. Obtiveram, para a produção de vacina, alfa toxina, concentrada em membrana de diálise contra polietilenoglicol, com alto título de 20.000 DMM/mL, pela técnica de bioensaio em camundongos. A titulação dos soros obtidos em coelhos vacinados apresentou resultado de 15 UI/mL de alfa antitoxina de *Clostridium novyi* tipo B.

Webster & Frank (1985) compararam a resposta imune estimulada pela administração de vacinas com multicomponentes, contra clostridioses, em carneiros, coelhos e cobaios, obtendo como resultado de 18 UI/mL de alfa antitoxina de *Clostridium novyi* tipo B em carneiros, 2,7 UI/mL em coelhos 33,3 UI/mL em cobaios.

Harbola & Verma (1988) avaliaram a resposta imunogênica de toxóide de *Clostridium novyi* tipo B vacinando carneiros e cobaios, obtiveram níveis de alfa antitoxina de 2,5 UI/mL e 15 UI/mL, com igual dose de toxóide de 0,5 mL, para carneiros e cobaios, respectivamente. Com uma dose de 0,2 mL o título obtido foi de 2,1 UI/mL e 10 UI/mL. O toxóide foi preparado a partir de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B com título de 2.000 DMM/mL.

Amimoto et al. (1998) avaliaram o efeito protetor de um alfa toxóide de *Clostridium novyi* tipo B vacinando cobaios e os desafiando com 100 DL₅₀ de suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B. Obteve como resposta proteção dos animais desafiados provando ser possível o emprego do toxóide em substituição a bacterina na formulação das vacinas. Utilizaram alfa toxina produzida e concentrada por ultrafiltração, com membrana de retenção de 50 KDa.

A eficiência das vacinas contra clostridioses relaciona-se à natureza dos antígenos que as compõem, sendo estes toxóides e/ou bacterinas. São altamente antigênicos, 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).

No Brasil, estudos têm sido realizados com vacinas contra clostridioses, para avaliação da qualidade das mesmas. Lobato (1989) ao avaliar as vacinas antitubulínicas comercializadas no Brasil, constatou que nenhum dos produtos testados foi eficiente para estimular resposta imune 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 apresentou níveis mínimos de anticorpos neutralizantes nos animais imunizados. Recentemente, Lobato et al. (2000) ao avaliarem seis toxóides de *Clostridium perfringens* tipo C e D comercializados no Brasil, constataram que apenas dois toxóides foram capazes de estimular níveis de anticorpos compatíveis com os exigidos nos testes oficiais. Balsamão (2001) ao avaliar a potência para *Clostridium sordellii* de vacinas comerciais constatou que apenas três vacinas em doze testadas estimularam resposta imune protetora contra desafio direto em cobaios.

O Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (OIE, 2000) apresenta os princípios para a produção de vacinas veterinárias, com recomendação para a utilização da European Pharmacopeia e Code of Federal Regulations – CFR/EUA, como referências para os testes de potência para a avaliação da qualidade das vacinas.

Os métodos de controle das vacinas contra clostridioses no Brasil estão definidos por

normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para as vacinas contra clostridioses as normas foram definidas pela Portaria 49/97 (Brasil, 1997). A norma de controle das vacinas contra Botulismo é a Instrução Normativa n.º 23/02 (Brasil, 2002).

Para o controle da vacina contra a Hepatite Necrótica Infecciosa provocada por *Clostridium novyi* tipo B é recomendada a British Pharmacopeia (1985). É estabelecido o nível mínimo de alfa antitoxina em 3,5 UI/mL, determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos, pela titulação de soros de coelhos vacinados. Além deste teste, estabelece as provas de esterilidade e inocuidade. Os procedimentos e os níveis constantes desta farmacopéia são os mesmos da European Pharmacopeia (1998).

Nos Estados Unidos da América a norma utilizada está inserida no Code of Federal Regulations – CFR (EUA, 2002). Esta norma estabelece o nível mínimo de alfa antitoxina de *Clostridium novyi* tipo B em 0,5 UI/mL, determinado pela titulação de soros de coelhos vacinados pela técnica de soroneutralização em camundongos. Este nível foi estabelecido em 1990. Sendo que até o ano de 1989 era recomendado o desafio direto em cobaias com suspensão de esporos padronizada de *Clostridium novyi* tipo B (Kolbe & Hauer, 1995).

O método de desafio direto em cobaias é o recomendado para *Clostridium Chauvoei*.

(Brasil, 1997). Este método é proposto por Neves (1997), em seu estudo, para a avaliação da eficácia de vacina contra hemoglobinúria bacilar provocada por *Clostridium haemolyticum* (*Clostridium novyi* tipo D), e foi utilizado por Balsamão (2001) na avaliação de vacinas contra *Clostridium sordellii*.

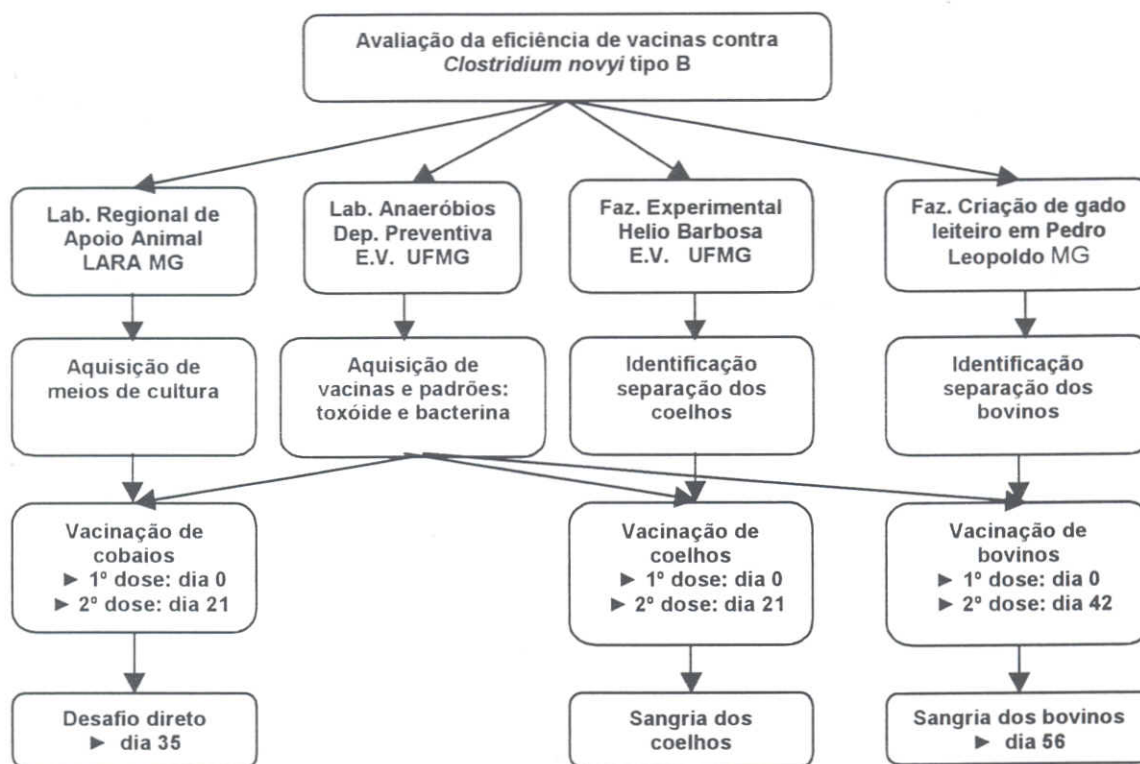
Métodos alternativos têm sido estudados em substituição aos testes in vivo, como o teste de ELISA proposto por Wood (1991) quando avaliou o teste de potência para *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani* e *Clostridium septicum*. Demonstrou correlação com o teste de soroneutralização em camundongos, ($r = 0.84$). Uma das vantagens do teste de ELISA seria proporcionar grande redução do número de animais de laboratório e do tempo para a realização dos testes, de setenta e duas horas, no teste de soroneutralização em camundongos, para três horas no teste de ELISA (Wood, 1991).

Normas gerais, como a Lei 8078/90, conhecida como Código de Defesa do Consumidor, estabelece clara responsabilidade dos fabricantes pela qualidade de seus produtos, podendo ser referência para a exigência de produtos de qualidade assegurada (Brasil, 1990). Ainda, a Portaria 301/96 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que estabelece as "Normas Complementares do Regulamento de Fiscalização de Produtos Veterinários e dos Estabelecimentos que os Fabriquem e/ou Comerciem" (Brasil, 1996).

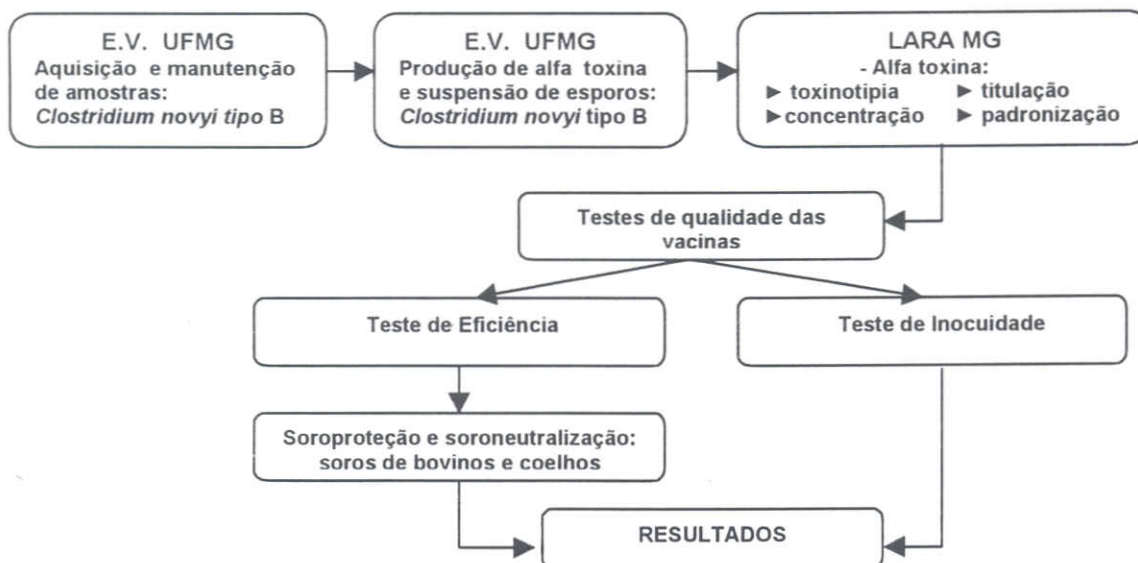
3 - MATERIAL E MÉTODOS

Fluxogramas com destaque das principais etapas desenvolvidas na execução do experimento proposto.

Fluxograma 1: Local de realização do experimento e vacinação dos animais.



Fluxograma 2: Produção de reagentes e Testes de Qualidade das vacinas.



3.1 - Local de realização do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na Fazenda Experimental Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Igarapé MG, em uma fazenda de criação de gado bovino leiteiro na região de Pedro Leopoldo MG, no Setor de Botulismo, Setor de Imunoquímica e Infectório do Laboratório Regional de Apoio Animal/LARA MG, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Pedro Leopoldo MG.

3.2 - Aquisição das vacinas

Foram adquiridas, de forma aleatória e diretamente em casas comerciais de produtos veterinários, de Minas Gerais e São Paulo, 13 vacinas de 11 laboratórios,

que no ano de 2001 produziram e comercializaram no país vacinas que apresentavam em sua composição *Clostridium novyi* tipo B.

Foram avaliadas as condições de conservação no revendedor, observando-se o período de validade e mantidas de acordo com especificações do fabricante, entre 4°C e 8°C.

Como controle foram empregados uma bacterina-toxóide padrão IRP 207, um toxóide padrão IRP 249, suspensão de esporos padrão IRP 307 e antitoxina padrão IRP 298 adquiridos no U.S. Department of Agriculture, Animal Plant Health Inspection Service – APHIS, Estados Unidos da América.

Laboratórios, vacinas testadas e controles utilizados foram codificados em letras e números e são apresentados na Tabela 1, com a respectiva composição antigênica.

Tabela 1: Codificação de laboratórios, vacinas, controles, composição antigênica das vacinas avaliadas e controles utilizados.

Laboratório	Código	Composição
L 1	T 1	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D
L 2	T 2	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. novyi</i> (B), <i>C. perfringens</i> tipos C e D
L 3	T 3	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D
L 3	T 4	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. botulinum</i> tipos C e D
L 4	T 5	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D, <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. haemolyticum</i>
L 5	T 6	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B e D
L 6	T 7	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D
L 7	T 8	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D
L 8	T 9	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D
L 9	T 10	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D
L 10	T 11	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i>
L 11	T 12	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D
L 11	T 13	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. botulinum</i> tipos C e D, <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i>
APHIS	T 14	Bacterina toxóide Padrão IRP 207
APHIS	T 15	Toxóide IRP 249
CONTROLE	T 16	Solução Salina 0,85%

3.3 – Animais

Camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, de ambos os sexos, com peso entre 16g a 20g, oriundos do Biotério do

Laboratório Regional de Apoio Animal em Pedro Leopoldo (LARA/MG).

Cobaias albinas, *Cavia porcellus*, da linhagem English Short Ear, de ambos os sexos, com peso entre 350 e 450g, oriundos

do Biotério do Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura e Abastecimento em Campinas (LARA/SP).

Coelhos, da raça Nova Zelândia, de ambos os sexos e com pesos entre 1,8Kg e 2,6kg, oriundos da Fazenda Experimental Hélio Barbosa da UFMG em Igarapé.

Bovinos mestiços, Holandês/Gir, com idade entre sete meses e oito meses, de ambos os sexos, identificados com brincos numerados, oriundos de uma fazenda de criação de gado bovino leiteiro da região de Pedro Leopoldo MG.

3.4 - Amostras de *Clostridium novyi* tipo B utilizadas

Foi utilizada uma amostra de *Clostridium novyi* tipo B (ATCC 25758), adquirida junto a American Type Culture Collection (ATCC) dos Estados Unidos da América (EUA), e quatro amostras oriundas de laboratórios comerciais produtores de vacinas contra clostridioses no Brasil.

3.5 - Meios de Cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Cooked Meat Medium (CMM)¹, Reinforced Clostridial Medium (RCM)², Agar sangue com 8% de sangue desfibrinado de carneiro (AS)³, Meio de Kolbe⁴, Tripitic Soy Broth (TSB)⁵, caldo BHI (Brain Heart Infusion)⁶, Caldo Tarozzi⁷ e meios para produção de toxinas: Amimoto (1998), Ardehali (1984) e Cardella (1958), modificado pela adição de tampão fosfato.

3.6 - Cultivo da amostras

As amostras de *Clostridium novyi* tipo B foram reconstituídas conforme recomendação da ATCC e semeadas em

¹ OXOID, Columbia, USA

² MERCK, Darmstadt, Germany

³ GMA, St. Louis, USA

⁴ Meio sólido para produção de esporos, segundo Kolbe et al., 1981.

⁵ MERCK, Darmstadt, Germany

⁶ OXOID, Hampshire, England

⁷ Caldo Tarozzi para cultivo de bactérias anaeróbias, segundo Bier, 1966.

CMM e Caldo Tarozzi, incubadas a 37°C, em jarra de anaerobiose⁸, com mistura gasosa⁹ composta de 10% de H₂, 10% de CO₂ e de 70 de N₂, em 0 mm/Hg, por um período de até 36 horas.

3.7 - Manutenção das amostras

As culturas obtidas em CMM foram incubadas em anaerobiose a 37°C por um período de 24 horas. Os crescimentos bacterianos obtidos foram centrifugados¹⁰ a 8000 x g a 4°C por 20 minutos. Após lavagem com solução salina¹¹ 0,85% (p/v) foi descartado o sobrenadante. O sedimento ressuspendido em leite em pó a 10% e liofilizado segundo Rudge (1983).

3.8 - Toxinas

3.8.1 - Seleção da amostra

Todas as amostras foram avaliadas. A alfa toxina foi titulada, para a seleção da amostra a ser utilizada no experimento, utilizando-se diluições decimais, a partir da alfa toxina pura até a diluição 1:10.000, em solução salina peptonada¹² a 1%. Inocularam-se cinco camundongos, com peso entre 16g a 20g, por diluição, pela via endovenosa, observando-se, por um período de 72 horas, quanto à ocorrência de morte. O meio de Cardella (1958) foi utilizado na seleção da amostra para os ensaios do experimento. O critério adotado para a seleção estava relacionado com a amostra que apresentasse o maior título nos testes de titulação em camundongos.

3.8.2 - Avaliação de meios para produção de toxina

A amostra de *Clostridium novyi* tipo B selecionada (item 3.8.1), foi cultivada em três meios para produção de toxina: meio proposto por Amimoto (1998), meio proposto por Ardehali (1984) e por Cardella (1958), modificado pela adição de tampão

⁸ OXOID, Hampshire, England

⁹ AGA - Gases Especiais

¹⁰ MLW - K26, Berlim, Germany

¹¹ MERCK, Rio de Janeiro, Brasil

¹² MERCK, Rio de Janeiro, Brasil

fosfato e ajustado o pH para 7,6. A amostra, inicialmente, foi repicada em CMM e incubada em anaerobiose, a 37°C por um período de 24 horas. Inoculou-se 10% de volume de cultura, do mesmo inóculo, nos meios para produção de toxina. Incubaram-se, sem agitação, os três meios a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação centrifugou-se cada meio a 8000 x g / 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membrana com porosidade média de 0,2 µm.

A alfa toxina foi detectada pelo bioensaio em camundongo, inoculando-se dois camundongos, com peso de 16g a 20g, para cada diluição seriada decimal, pela via endovenosa, observando-se os animais, por um período de 72 horas, quanto à ocorrência de morte. O sobrenadante, referente à amostra que apresentou maior título nesta prova, foi concentrado por ultrafiltração com membrana de retenção de 10 KDa (Amicon-Milipore Corporation U.S.A.). Os filtrados, contendo alfa toxina, foram precipitados pela adição de sulfato de amônio¹³. Adicionou-se 35 g de sulfato de amônio para cada 100 mL de filtrado e homogeneizado lentamente por agitação magnética durante 30 minutos e mantido em repouso a 4°C por 18 horas. O precipitado foi separado por centrifugação (8000 x g), sob refrigeração a 4°C, por 20 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado mais 2,5g de sulfato de amônio para cada 100 mL, até que nenhum precipitado fosse formado. As frações precipitadas foram dialisadas contra água destilada estéril por 24 horas a 48 horas para eliminação do sulfato de amônio residual (Jansen, 1961).

A alfa toxina, obtida após o processo descrito, foi detectada através de bioensaio em camundongo, inoculando-se para cada diluição dois camundongos, com peso de 16g a 20g, pela via endovenosa observando-se os animais, por um período de 72 horas, quanto à ocorrência de morte.

3.8.3 - Titulação da toxina

A alfa toxina foi titulada em camundongos, determinando-se DL₅₀ e DMM.

Utilizaram-se diluições seriadas decimais, a partir da alfa toxina pura e até a diluição de 1:10.000, em solução salina peptonada a 1%, para determinação da dose letal 50% – DL₅₀. Para cada diluição foram inoculados dois grupos de cinco camundongos pesando entre 16g a 20g, com 0,2 mL de alfa toxina, por via endovenosa e intramuscular e observado por 72 horas, quanto à ocorrência de morte.

A determinação da dose mínima mortal – DMM foi realizada em duas etapas, em diluições sucessivas, inoculando-se cinco camundongos, com peso entre 16g a 20g, pela via endovenosa, com a dose de 0,2 mL. (Anexo I)

3.8.4 – Toxinotipia

Para confirmação da alfa toxina produzida foi utilizada a metodologia descrita por Batty & Glenn (1947), com modificações, que consistiu na mistura de 1,0 mL da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B com 1,0 mL de antitoxina homóloga, APHIS/IRP 298, contendo 1,0 UI/mL. A mistura foi mantida em banho-maria¹⁴, a 37°C, por 60 minutos, e administrados 0,2 mL em 2 camundongos, com peso entre 16g a 20g, pela via endovenosa. Os camundongos foram observados por um período de 72 horas quanto à ocorrência de morte. O tipo de toxina foi confirmado pela sobrevivência dos camundongos inoculados com a mistura toxina e antitoxina homólogos. Como controle positivo, 1,0 mL de alfa toxina foi misturada a 1,0 mL de solução salina 0,85% e mantidas nas mesmas condições da mistura soro padrão e alfa toxina. Foram inoculados dois camundongos com a mesma dose de alfa toxina e pela mesma via. A prova foi considerada válida quando os camundongos inoculados com a mistura alfa toxina e salina 0,85 % morreram em até 72 horas de observação.

¹³ MERCK, Rio de Janeiro, Brasil

¹⁴ FANEM LTDA

3.9 - Dosagem protéica

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de biureto, comparado à curva padrão de soroalbumina bovina (BSA)¹⁵ pela leitura em densidade ótica (DO) a 690 nm de absorvância em espectrofotômetro¹⁶, segundo metodologia empregada no LARA/MG (Ferreira, A. J., comunicação pessoal, 2002).

3.10 - Manutenção da toxina

A alfa toxina produzida foi distribuída em frascos com 1,0 mL e separadas em dois grupos, sendo um mantido estocado a -70°C e o outro grupo foi mantido estocado a +4°C.

3.11 - Padronização da toxina

A alfa toxina produzida foi padronizada ao nível de teste L+/100, menor quantidade de toxina capaz de provocar a morte em no mínimo 80% dos camundongos quando misturada a um soro padrão com 0,1 UI/mL (EUA/CFR, 2002), pelo método de soroneutralização em camundongos, que consistiu na diluição seriada da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, com fator entre as diluições de 1,2. A mistura toxina diluída com 0,1 UI/mL de antitoxina homóloga, APHIS/IRP 298, foi mantida em banho-maria¹⁷ a 37°C por 60 minutos. Após a incubação foram administrados 0,2 mL em cinco camundongos, com peso entre 16g a 20g, por diluição, pela via endovenosa, observando-se por 72 horas, quanto a ocorrência de morte. A dose teste foi determinada a partir da última diluição em que ocorreu morte de no mínimo 80% dos camundongos inoculados. (Anexo II)

3.12 - Produção de esporos

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

¹⁵ SIGMA, St. Louis, USA

¹⁶ MICRONAL - B 256

¹⁷ FANEM LTDA

3.12.1 - Preparação dos meios de cultura

Para a preparação do meio de Kolbe, 100g de fígado bovino¹⁸ foram cortados em cubos de 2,0 x 2,0 x 2,0 cm e colocados em 200 mL de água destilada. A seguir, foi adicionado 0,2g de papaína¹⁹ dissolvida em 5,0 mL de água destilada e o pH final, de 7,2, foi obtido pela adição de hidróxido de sódio²⁰ 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. O sobrenadante foi clarificado, por passagem em papel filtro, e ajustado para pH 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N. A cada 100 mL do filtrado final, adicionou-se: tripticase²¹ - 4,0g; ágar bacteriológico²² - 2,0g; extrato de levedura²³ - 1,0g. O meio foi distribuído em frascos tipo erlenmeyer de 500 mL, contendo cada um 100 mL de meio, autoclavados a 121°C, por 25 minutos.

3.12.2 - 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 gasosa²⁴ composta de 10% de H₂, 10% de CO₂ e de 70 de N₂ e mantidas nesta atmosfera durante as 24 horas que antecederam a semeadura. Após este período, cada frasco foi inoculado com 2,0 mL de uma cultura de 18 horas de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, incubadas a 37°C, em meio TSB.

A cultura foi distribuída sobre o ágar, 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.

¹⁸ Fígado procedente de estabelecimento com Inspeção Federal.

¹⁹ SIGMA, St. Louis, USA

²⁰ MERCK, Rio de Janeiro, Brasil

²¹ MERCK, Darmstadt, Germany

²² MERCK, Darmstadt, Germany

²³ SIGMA, St. Louis, USA

²⁴ WHITE & MARTINS

3.12.3 - Coleta da suspensão bacteriana

Após o período de incubação, adicionou-se a cada frasco pérolas de vidro com três mm de diâmetro e uma solução de 25 mL de tampão fosfato (0,05M - KH_2PO_4 ²⁵ - Na_2HPO_4 ²⁶), 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 frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade, previamente esterilizado, contendo 50 mL de glicerina e uma barra magnética para homogeneização completa. Essa mistura foi mantida à temperatura ambiente, durante 14 dias. A presença de esporos foi verificada à microscopia óptica, com aumento de 1000 x, pela coloração específica de esporos (Kolbe, 1981).

3.12.4 - Provas de Pureza

A suspensão de esporos glicerizada foi inoculada em placas de ágar sangue, em tubos contendo meio TSB e em caldo BHI e incubados em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 72 horas (Smith, 1984).

3.12.5 - Titulação da suspensão de esporos

A titulação da suspensão de esporos glicerizada foi realizada utilizando-se diluição decimais em solução salina tamponada a 1%, pH 7,0 e a dose letal a 50% - DL_{50} foi calculada pelo método Reed & Muench (1938).

Para cada diluição foram inoculados cinco cobaios, pesando entre 350 – 500 g, com 0,5 mL de suspensão contendo 0,25 mL de cada diluição e 0,25 mL de cloreto de cálcio²⁷ 5%, por via intramuscular. Os animais foram observados por 72 horas, quanto à ocorrência de morte.

²⁵ MERCK, Darmstadt, Germany

²⁶ FISHER, New Jersey, USA

²⁷ Merck S.A. - Brasil, Rio de Janeiro

3.12.6 – Controle

Como controle da técnica foi utilizada uma suspensão de esporos padrão adquirida no U.S. Department of Agriculture Animal Plant Health Inspection Service - APHIS/EUA, amostra IRP 307.

3.12.7 - Manutenção da suspensão de esporos

Confirmados os resultados dos testes de pureza e potência, a suspensão de esporos glicerizada, em alíquotas de 1 mL, foi mantida a -70°C.

3.13 - Teste de eficiência das vacinas

A metodologia utilizada para avaliação das vacinas e as normas de interpretação da prova obedeceram ao preconizado por British Pharmacopeia (1985), European Pharmacopeia (1998) e Code Of Federal Regulations – CFR (EUA, 2002).

As vacinas também foram testadas com desafio direto em cobaios conforme preconizado pelo APHIS/CFR (Kolbe & Hauer, 1995).

3.13.1 – Esterilidade

Todas as vacinas obtidas comercialmente foram consideradas estéreis por apresentarem em sua composição *Clostridium chauvoei*, e serem, portanto testadas oficialmente no Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em Porto Alegre – LARA RS, antes de sua liberação para o comércio.

3.13.2 – Inocuidade

Para esta prova foram observados os mesmos cobaios utilizados na prova de desafio direto, (item 3.15).

3.13.3 – Esquema de vacinação, coleta de soro e desafio.

Em coelhos:

Para cada vacina foram utilizados dez coelhos. Os animais apresentavam-se

cl clinicamente saudáveis e livres de parasitas externos. Durante o experimento foram mantidos em gaiolas individuais, no mesmo local e recebendo a mesma alimentação, constituída de ração balanceada. Foram vacinados pela via subcutânea, com metade da dose recomendada para bovinos. No grupo testemunha a vacina foi substituída por solução salina a 0,85%. Os coelhos receberam a primeira dose no dia zero, uma segunda dose das respectivas vacinas, 21 dias após a primeira dose. Quatorze dias após a segunda vacinação todos os animais foram sangrados e os soros dos dez coelhos foram misturados em partes iguais, constituindo um "pool", representando cada uma das vacinas. Os soros foram estocados a -20°C até o momento dos testes sorológicos (European Pharmacopeia, 1998).

Em bovinos:

Para cada vacina foram utilizados seis bovinos, com idade entre sete e oito meses, de ambos os sexos. Os animais apresentavam-se clinicamente saudáveis e livres de parasitas externos. Foram mantidos na mesma área de pastagem, constituída de *Brachiaria decumbens* e receberam ração balanceada. Foram vacinados pela via subcutânea, com a dose recomendada para a espécie. No grupo testemunha a vacina foi substituída por solução salina a 0,85%. Os animais receberam uma segunda dose das respectivas vacinas 42 dias após a primeira dose. No dia 0, 42 e 56 após a primovacinação todos os bovinos foram sangrados e o soro de cada bovino foi estocado a -20°C, até o momento dos testes sorológicos.

As vacinas codificadas como T14 e T15 não foram inoculadas. T14 referia-se a bacterina padrão, utilizada nos testes em cobaio e T15 referia-se ao toxóide padrão, utilizado nos testes em coelhos.

Em cobaios:

Para cada vacina foram utilizados dois grupos (I e II) de oito cobaios. Nos grupos controles, com cinco cobaios cada um, a vacina foi substituída por solução salina a 0,85%. Os animais apresentavam-se

cl clinicamente saudáveis, livres de parasitas externos, mantidos separados de acordo com o sexo, no mesmo local, recebendo na alimentação ração balanceada. As inoculações foram pela via subcutânea, na área dorsal do tórax, sendo a primeira dose no lado direito e a segunda dose no lado esquerdo, com um quinto da dose recomendada para bovinos. Os cobaios receberam a segunda dose das respectivas vacinas 21 dias após a primeira dose. Quatorze dias após a segunda vacinação todos os cobaios foram desafiados com 0,25 mL de suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B, contendo 100 DL₅₀, juntamente com 0,25 ml de CaCl₂ a 5%. Os animais foram observados por 72 horas, anotando-se os sobreviventes e mortos. Os cobaios do Grupo I foram desafiados com suspensão de esporos APHIS/IRP 307 padrão e os do grupo II com suspensão de esporos produzidas para o experimento.

3.14 – Provas sorológicas

3.14.1 – Soroproteção

O teste de soroproteção em camundongos, frente à alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B em nível de teste de 2,5 DL₅₀, foi realizado nas misturas de soro dos coelhos e nos soros dos bovinos. Utilizou-se 1,0 mL de soro misturado a 1,0 mL de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, contendo 2,5 DL₅₀, homogeneizado e mantido a 37°C, durante 60 minutos. Como controle positivo 1,0 mL de alfa toxina foi misturada a 1,0 mL de solução salina 0,85% e mantidas nas mesmas condições da mistura soro alfa toxina. Após foram inoculados dois camundongos, com 0,2 mL da mistura, pela via endovenosa, de ambas as misturas. A soroproteção é confirmada quando ocorre sobrevivência dos animais inoculados com a mistura soro e alfa toxina e a prova considerada válida quando ocorre morte dos animais inoculados com a mistura alta toxina e salina.

3.14.2 – Soroneutralização

O teste de soroneutralização em camundongos foi empregado para titulação das misturas de soros de coelhos e nos

soros dos bovinos que foram positivos ao teste de soroproteção. Foram preparadas misturas contendo a dose teste de toxina em L+/100, segundo metodologia descrita no Code Federal Regulations, CFR (EUA, 2002). Como controle do teste foi utilizado alfa antitoxina padrão, APHIS/IRP 298, com 1,0 UI/mL.

3.14.3 - Interpretação do Teste de Eficiência

Os níveis mínimos de anti-alfa toxina exigidos para a vacina ser considerada satisfatória são: Brasil (1997), British Pharmacopeia (1985) e European Pharmacopeia (1998) título mínimo de 3,5 UI/mL; Code of Federal Regulations (EUA, 2002) título mínimo de 0,5 UI/mL.

3.15 - Interpretação da prova de desafio direto em cobaios

Para a interpretação da prova de eficácia, foi seguida a norma determinada segundo APHIS/EUA. (Kolbe & Hauer, 1995):

- a prova foi considerada válida se, no mínimo, quatro das cinco testemunhas inoculadas não sobreviveram;
- a vacina foi considerada eficaz se houve a sobrevivência de, no mínimo, sete dos oito animais vacinados;
- a vacina deveria ser retestada se houvesse 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 ultrapassasse a quatro animais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de *Clostridium novyi* tipo B empregadas neste experimento, sendo uma de origem da ATCC, n.º 25758, e quatro de laboratórios que produzem vacinas contra clostridioses, no Brasil, foram confirmadas como *Clostridium novyi* tipo B pelo teste de toxinotipia, não ocorrendo morte dos animais inoculados com a mistura de alfa toxina e antitoxina homóloga. Em trabalhos similares, Lobato (1989) e Azevedo et al. (1998) em estudos de avaliação de

qualidade de vacinas comerciais contra *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D e *Clostridium perfringens* tipo C e tipo D, respectivamente, confirmaram o tipo de toxina produzido, em seus experimentos, através desta técnica, que se mostrou adequada para identificação das amostras analisadas.

Os meios de cultura utilizados para o crescimento e manutenção das amostras mostraram-se adequados, sendo o melhor crescimento bacteriano obtido em torno de 18 horas, constatado por aumento de produção de massa bacteriana, caracterizado por produção de gás, turbidez do meio de cultura, formação de precipitado nos tubos, quando comparado a crescimento em 6 e 12 horas. Resultados semelhantes obtiveram Ball et al. (1993) em experimento realizado com *Clostridium novyi* tipo A.

Definido o período de crescimento, as amostras foram avaliadas e selecionadas quanto à capacidade toxigênica, inoculando-se o sobrenadante do meio de crescimento em camundongos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Título em dose Mínima Mortal por mililitro das diferentes amostras de *Clostridium novyi* tipo B, em Cooked Meat Medium.

<i>Clostridium novyi</i> tipo B	Título em DMM/mL
ATCC 25758	100
Laboratório 1	10
Laboratório 2	10
Laboratório 3	10
Laboratório 4	10

A amostra de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, apresentou o título mais elevado. Este procedimento é semelhante ao adotado por Harbola & Verma (1988) que ao avaliar quatro amostras de *Clostridium novyi* tipo B constatou diferentes resultados entre as mesmas, indicando a necessidade da avaliação de todas as amostras de *Clostridium novyi* tipo B quando sua utilização destina-se ao controle de

qualidade das vacinas ou mesmo a produção de imunógenos.

Utilizou-se a amostra de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, para avaliar outros meios de produção de toxina. Os resultados obtidos com os três meios utilizados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Título em dose Mínima Mortal por mililitro com diferentes meios para produção de alfa toxina pelo *Clostridium novyi* tipo B (ATCC 25758), pela via intramuscular e via endovenosa.

Meio	pH	Resultado DMM/mL	
		Via IM ¹	Via EV ²
CARDELLA (1958)	7,6	200	200
ARDEHALI (1984)	8,0	100	100
AMIMOTO (1998)	7,5	100	100

(1) Inoculado 0,2 mL por via intramuscular

(2) Inoculado 0,2 mL por via endovenosa

Os resultados demonstraram que o meio de Cardella (1958) modificado poderia ser utilizado no experimento. Este meio foi utilizado em outros estudos na produção de toxinas, como no experimento executados por Lobato (1989) na produção de toxinas botulínicas dos tipos C e D.

A via de inoculação foi outro aspecto considerado no início do experimento. A via recomendada pela European Pharmacopeia (1998) é a via intramuscular, e no Code of Federal Regulations (EUA, 2002) é recomendado à via endovenosa. Como os resultados obtidos, Tabela 2, demonstraram não haver diferença entre as vias, optou-se pela via endovenosa, nos testes sorológicos empregados no experimento.

Os níveis de acidez, apresentados na Tabela 3, em índices de pH, referem-se a recomendação dos pesquisadores citados.

Definido o meio de produção de toxina, Cardella (1958) modificado, todas as amostras foram novamente avaliadas,

observada as mesmas condições, os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Título em Dose Mínima Mortal por mililitro de alfa toxina produzida com diferentes amostras de *Clostridium novyi* tipo B, utilizando-se meio de Cardella (1958).

<i>Clostridium novyi</i> tipo B	Título em DMM/mL
ATCC 25758	400
Laboratório 1	100
Laboratório 2	100
Laboratório 3	100
Laboratório 4	10

Pelos resultados, optou-se pela amostra de *Clostridium novyi* tipo B origem ATCC 25758 para o desenvolvimento do experimento. A referida amostra foi repicada no meio de Cardella (1958) modificado, incubado a 37°C, por 24h. Com a alfa toxina produzida e submetida ao processo de ultrafiltração com membrana de 10 KDa, obteve-se uma concentração final de 80 vezes. A toxina concentrada, e precipitada com sulfato de amônio, foi titulada em camundongos obtendo-se um título de 2000 DMM/mL.

Outros autores obtiveram bons resultados utilizando membrana de retenção com ponto de corte diferente, como Amimoto et al. (1998) utilizando membrana de 50 KDa, obtiveram 7820 DMM/mg de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, pela titulação em camundongos. Pietrzykowski et al. (1991), que utilizando uma membrana com ponto de corte de 100 KDa, obtiveram título de 1000 DMM/mL, pela titulação em camundongos. Harbola & Verma (1988), mesmo sem processo de concentração, obtiveram título de 2000 DMM/mL após 48 horas de cultivo em meio de cultura. Os diferentes títulos obtidos nos trabalhos citados ratificam a necessidade da padronização da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, como recomendado por normas internacionais de referência (European Pharmacopeia, 1998).

A padronização da toxina frente a 0,1 UI/mL de antitoxina alfa, apresentou uma dose de teste de 5 L+/100/mL. Cada dose teste apresentou um título de 20 DL₅₀ e 0,13 mg de proteína, sendo considerada adequada para utilização no experimento ao atender os níveis mínimos fixados pela European Pharmacopeia (1998), que são de 10 DL₅₀ e 0,05 mg de proteína. Esta concentração de proteína é estabelecida para toxina concentrada e purificada, sendo que no presente trabalho, dosou-se a toxina após precipitação em sulfato de amônio, o que poderia explicar os níveis de proteína 2,6 vezes maior. O título de 2000 DMM/mL de alfa toxina precipitada, titulada em camundongos, foi igual ao obtido anteriormente a precipitação. Observou-se que a morte dos animais inoculados com toxina precipitada ocorreu em um período de tempo mais curto, 24 horas após inoculação, comparado a 72 horas antes da precipitação.

A toxina produzida foi avaliada em relação ao tempo e às temperaturas de estocagem a + 4°C e - 70°C, pela técnica de bioensaio em camundongos. Os títulos obtidos foram iguais nas duas temperaturas testadas e se mantiveram por todo o período estudado demonstrando a estabilidade da toxina. (Tab. 5).

Tabela 5: Título em Dose Mínima Mortal por mililitro de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B (ATCC 25758), estocadas a + 4°C e - 70°C, avaliados durante seis meses, após concentração.

Tempo (meses)	Título em DMM/mL	
	+ 4°C	- 70°C
1	2000	2000
2	2000	2000
3	2000	2000
4	2000	2000
5	2000	2000
6	2000	2000

Estes resultados estão de acordo com os relatos de Ball et al. (1993) onde informaram a estabilidade da alfa toxina a +4°C, como uma de suas propriedades.

A produção da suspensão de esporos, para as provas de desafio direto em cobaias, no meio descrito por Kolbe et al. (1981), apresentou bons resultados, pelo grande crescimento na superfície do meio. A presença de esporos foi confirmada pela técnica de coloração de esporos com verde malaquita.

A suspensão bacteriana produzida no meio sólido encontrava-se fortemente aderido a este. A utilização de pérolas de vidro mostrou-se eficiente para remoção da suspensão bacteriana na superfície do agar. A utilização da solução tampão sem o auxílio das pérolas de vidro não foi suficiente para a completa remoção da suspensão bacteriana, pois, parte ficou aderida ao meio sólido sendo impossível sua retirada por métodos que permitissem garantir a esterilidade da suspensão, bem como não interferissem na titulação final da suspensão de esporos. Técnica semelhante foi utilizada por Neves (1997) na produção de suspensão de esporos de *Clostridium haemolyticum* e por Balsamão (2001) na produção de esporos de *Clostridium sordellii*.

A suspensão de esporos quando inoculada em BHI e ágar-sangue e incubadas em ambiente de aerobiose mostrou-se estéril, não sendo observado nenhum crescimento bacteriano. Em anaerobiose houve crescimento no caldo Tarozzi, em razão da coluna líquida que favoreceu o crescimento do agente, caracterizado na coloração de gram como bastonetes gram-positivos.

Os resultados da titulação em DL₅₀/mL da suspensão de esporos produzida e da fornecida pela APHIS/EUA são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Título em Dose Letal 50 % por mililitro da suspensão de esporos produzida e do padrão APHIS/EUA, IRP 307, de *Clostridium novyi* tipo B em cobaias inoculadas por via intramuscular.

Amostra	DL ₅₀ /mL
Suspensão de esporos	10.000
APHIS	24.000

A diluição da amostra desafio produzida e do padrão em que estavam contidas as 100DL₅₀ em 0,25 mL foi de 1:100 e 1:240, respectivamente. A suspensão de esporos glicerizada mantida a -70°C mostrou-se estável durante seis meses, período de tempo do experimento.

Os resultados obtidos no teste de desafio em cobaios para os dois grupos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Teste de eficiência de vacinas contra clostridioses, contendo em sua composição *Clostridium novyi* tipo B, em cobaios vacinados e desafiados com suspensão de esporos por via intramuscular.

Laboratório	Vacina	Grupo I (1) Vivos/Total	Grupo II (2) Vivos/Total
L 1	T 1	8/8	8/8
L 2	T 2	8/8	8/8
L 3	T 3	0/8	0/8
L 3	T 4	0/8	0/8
L 4	T 5	8/8	8/8
L 5	T 6	0/8	0/8
L 6	T 7	0/8	0/8
L 7	T 8	0/8	0/8
L 8	T 8	0/8	0/8
L 9	T 10	8/8	8/8
L 10	T 11	8/8	8/8
L 11	T 12	0/8	0/8
L 11	T 13	0/8	0/8
APHIS	T 14	8/8	8/8
APHIS	T 15	Não inoculado	Não inoculado
Controle	T 16	0/5	0/5

1, 2 - Desafio com 100DL₅₀ de suspensão de esporos.

As vacinas T1, T2, T5, T10 e T11 protegeram os cobaios frente ao desafio, verificando-se sobrevivência de todos os animais. Sendo, portanto, consideradas eficientes, segundo protocolo da APHIS (Kolbe & Hauer, 1995).

A bactéria padrão, T14, utilizada como controle positivo apresentou o resultado esperado, com 100% de proteção e no grupo controle negativo T16, inoculado apenas com solução salina 0,85%, ocorreu morte de todos os animais em 24 horas após desafio. A vacina codificada como T15, Toxóide padrão, não foi inoculada por ter sido utilizada no teste sorológico em coelhos.

A prova de desafio em cobaios foi utilizada em outros estudos, como os realizados por Macheak et al. (1972), em trabalho no qual compararam a resposta imune de cobaios e carneiros, avaliando a potência de bacterinas contendo *Clostridium novyi* tipo B.

Amimoto et al. (1998) avaliaram o efeito protetor de alfa toxóide, contra *Clostridium novyi* tipo B, em cobaios desafiados com suspensão de esporos. O toxóide foi testado em cinco diferentes grupos de animais, determinando efeito protetor nos cobaios vacinados. No presente experimento, as vacinas codificadas como T2 e T5 informam, em seu material de divulgação, tratarem-se de um toxóide e semelhante ao estudo citado, também apresentaram proteção contra o desafio com suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B. Nas demais vacinas não havia informação disponível para confirmar se eram somente toxóides.

O teste de potência empregado neste experimento, para a avaliação de bacterinas contra *Clostridium novyi* tipo B, a partir da vacinação de cobaios e desafio com 100DL₅₀ de uma suspensão de esporos padronizada, mostrou-se prático e de fácil execução. Entretanto, a legislação Brasileira atual recomenda as provas sorológicas, (Brasil, 1997). Ressalta-se que os efeitos sobre o organismo causado por *Clostridium novyi* tipo B estão relacionados à ação direta da toxina e não da bactéria. Um toxóide deverá ser, preferencialmente, o indicado e sua eficiência em desencadear uma resposta imune satisfatória deverá ser assegurada.

A agência APHIS/EUA recomendou o teste de desafio em cobaios até o ano de 1989. Ocorrendo modificação para o teste de eficiência, utilizando-se provas sorológicas, determinando-se títulos de alfa antitoxina de *Clostridium novyi* tipo B em soros de coelhos vacinados, pela técnica de bioensaio, titulação em camundongos, a partir de 1990.

O resultado da triagem das misturas de soros de coelhos vacinados, pela

soroproteção em camundongos é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Soroproteção em camundongos frente a 2,5 Dose Letal 50% de alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B em "pool" de soros de coelhos vacinados nos dias 0 e 21, e sangrados no dia 35.

Laboratório	Soros	Soroproteção Vivo/inoculado
L 1	T 1	2/2
L 2	T 2	2/2
L 3	T 3	0/2
L 3	T 4	0/2
L 4	T 5	2/2
L 5	T 6	0/2
L 6	T 7	0/2
L 7	T 8	0/2
L 8	T 8	0/2
L 9	T 10	2/2
L 10	T 11	0/2
L 11	T 12	0/2
L 11	T 13	0/2
APHIS	T 15	2/2
TESTEMUNHA	T 16	0/2

A mistura de soros dos coelhos T1, T2, T5, T10 e T15 obtiveram resultado positivo no teste de soroproteção. Este teste foi também empregado em outros estudos, como na triagem de soros de animais imunizados por Lobato (1989) e Azevedo et al. (1998) em estudos de avaliação de qualidade de vacinas comerciais contra *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D, *Clostridium perfringens* tipo C e D, respectivamente, e Lobato et al. (2000) ao avaliar a resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* em bovinos e coelhos no Brasil. Este teste mostrou-se adequado para triagem dos soros a serem titulados posteriormente, permitindo redução significativa de animais de laboratório a serem utilizados no experimento dentro dos princípios da bioética.

Os resultados do título de anticorpos neutralizantes de alfa toxina da mistura de soro de coelhos dos grupos positivos ao teste de soroproteção são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B nas misturas dos soros de coelhos⁽¹⁾ vacinados com imunógenos comerciais e toxóide padrão.

Laboratório	Vacina	Antitoxina alfa (UI/mL)
L 1	T 1	8
L 2	T 2	2
L 4	T 5	3
L 9	T 10	12
APHIS	T 15	15

1 = Positivos ao teste de soroproteção em camundongos.

As vacinas T1 e T10 apresentaram níveis de anti-alfa toxina de 8 UI/mL e 12 UI/mL, respectivamente, e o toxóide padrão T15 de 15 UI/mL, superiores ao nível mínimo exigido na legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil de 3,5 UI/mL. (BRASIL, 1997).

As vacinas T2 e T5 apresentaram níveis de 2 UI/mL e 3 UI/mL, abaixo dos níveis exigidos pela legislação brasileira, mas superiores aos níveis exigidos nos Estados Unidos de 0,5 UI/mL. (EUA, 2002).

Os soros de bovinos vacinados com T1, T2, T5 e T10, que obtiveram resultado positivo ao teste de soroproteção foram submetidos à prova de soroneutralização em camundongos e os títulos de anticorpos neutralizantes para alfa toxina, no dia 56, 14 dias após primeira dose de vacina, são apresentados na Tabela 10. No dia 42, após primo vacinação, os animais apresentaram título $\leq 0,1$ UI/mL.

Tabela 10: Título de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B nos soros de bovinos coletados no dia 56.

Vacinas							
T1		T2		T5		T10	
Soro	Título	Soro	Título	Soro	Título	Soro	Título
05	3,5	06	3,5	110	1,0	93	3,5
23	5,0	102	1,0	112	1,0	106	5,0
104	5,0	105	3,5	123	1,0	122	3,5
116	5,0	109	3,5	125	1,0	124	3,5
211	3,5	202	3,5	177	3,5	129	5,0
213	3,5	205	1,0	231	3,5	216	5,0

Número do soro refere-se ao número de identificação dos bovinos.

Na avaliação da vacinação em bovinos, apenas quatro vacinas T1, T2, T5 e T10 induziram títulos de anticorpos neutralizantes para toxina alfa.

As vacinas T1, T2, T5 e T10 apresentaram títulos em coelhos e bovinos, respectivamente, de T1: 8 e 3,8 UI/mL; T2: 2 e 1,7 UI/mL; T5: 3 e 1,8 UI/mL; T10: 12 e 4,25 UI/mL. Estes títulos demonstraram ser a resposta em coelhos superior à obtida em bovinos.

Os títulos de anti-alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, nos bovinos, após a segunda dose de vacina, foi superior à primeira dose, semelhante a estudos anteriores como os realizados por Lobato et al. (2000) com vacinas contra *Clostridium perfringens* em bovinos e Azevedo et al. (1998) com vacinas contra *Clostridium perfringens* em cabras. Kerry & Graig (1979) em estudos com vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B em carneiros constataram diferenças entre primeira e segunda dose. Com uma única dose, apenas 3% dos animais vacinados apresentaram títulos superiores a 5 UI/mL, sendo que 14 dias após a segunda dose 97% dos animais apresentaram resultados superiores a 5 UI/mL.

Macheak et al. (1972) demonstraram que em carneiros o título de 1,6 UI/mL é suficiente para proteger os animais desafiados com suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B. Harbola & Verma (1988) determinaram, também em carneiros, como nível mínimo de proteção 0,4 UI/mL. Brown et al. (1976), estabeleceram que a

proteção em carneiros corresponde à proteção em bovinos contra desafio direto contendo 470 Dose Letal 50 % de suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B.

Comparando-se os resultados obtidos com o desafio direto em cobaios e os testes de detecção de anti-alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B em coelhos e bovinos constata-se que as vacinas codificadas como T1, T2, T5 e T10, que induziram resposta imunológica em coelhos e bovinos, também protegeram contra o desafio direto pela inoculação de suspensão de esporos nos cobaios vacinados. No entanto a vacina T11 apresentou proteção nos testes de desafio direto sem induzir resposta imunológica humoral detectável nos testes de titulação com alfa toxina. Em seu material de divulgação informa tratar-se apenas de bacterina. As informações referentes à vacina codificada como T2 e T5 atestam tratar-se de um toxóide contra *Clostridium novyi* tipo B, ressaltando que estas vacinas protegeram os cobaios vacinados contra o desafio direto com suspensão de esporos. As vacinas T1 e T10 não trazem informações suficientemente claras para confirmação se são somente toxóides. Certamente, critério rigoroso deveria ser adotado pelos laboratórios produtores, com informações claras, evitando qualquer dúvida para os produtores rurais ao utilizarem vacinas em seus rebanhos.

No presente estudo utilizou-se a titulação de anticorpos como teste de controle, em razão do mesmo ser o teste oficial de controle no

país (BRASIL, 1997), e também ser o teste adotado por outros países, como E.U.A. (Code of Federal Regulations, 2002) e países Europeus (European Pharmacopeia, 1998). O desafio direto em cobaios conforme protocolo APHIS/EUA, (Kolbe e Hauer, 1995), foi também utilizado e sua inclusão está relacionada diretamente à inexistência de dados consistentes nos rótulos das vacinas analisadas. Não está claramente informado, se a vacina é uma bacterina, uma bacterina-toxóide ou apenas toxóide. Mesmo com relação ao próprio *Clostridium novyi* somente duas vacinas, T2 e T8, informam tratar-se de *Clostridium novyi* tipo B, as demais vacinas fazem referência apenas a *Clostridium novyi*. No entanto, no registro de todas as vacinas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento constam como *Clostridium novyi* tipo B. (Araujo, A.A.J., comunicação pessoal, 2000). Soma-se a este fato que apenas em três vacinas, T6, T7 e T12 é informado ser destinada à prevenção da Hepatite Necrótica Infecciosa, enfermidade em que o *Clostridium novyi* tipo B é o agente etiológico.

Este fato pode estar relacionado ao grande crescimento da comercialização de vacinas contra clostridioses, um salto de 74 milhões de doses no ano de 1990 para 130 milhões de doses no ano 2000, praticamente dobrando o comércio em 10 anos, um mercado superior a 150 milhões de doses anuais, incluindo as vacinas contra o Botulismo no ano de 2002. Verificou-se na última década lançamentos de vacinas contra clostridioses com maior número de antígenos. Estas vacinas possuem registro recente. Das treze vacinas analisadas apenas quatro apresentaram registro entre a metade da década de 80 e 90, as outras nove vacinas o obtiveram a partir de 1995, tratando-se, portanto, de novos produtos. (Manual de Produtos Veterinários, 2001). Destaca-se o fato da ampla discussão e divulgação destas vacinas, com grande ênfase a partir da metade da década de 90, inclusive objeto de seminários e simpósios como o realizado em 1995, em Goiânia, pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, sobre clostridioses, com

destaque para as vacinas com múltiplos antígenos.

Sugere-se que a apressada competição por um mercado emergente leve os laboratórios produtores a lançarem novas vacinas contra clostridioses, com múltiplos agentes.

É de amplo conhecimento o fato da utilização da vacinas como medida preventiva das diversas enfermidades. No entanto, há que ressaltar que nos casos das vacinas contra clostridioses com múltiplos antígenos este fato merece atenção especial, uma vez que não existem diagnósticos rotineiros de confirmação de enfermidades ligados a diversos clostrídios constituintes destas vacinas. Exceção ao *Clostridium botulinum* e *Clostridium chauvoei*, cujos diagnósticos são de ampla divulgação.

Parece longínquo o tempo em que a prática da vacinação era repudiada pela população, como a revolta contra a vacinação obrigatória contra a varíola ocorrida em 1904, no Brasil, onde um dos questionamentos era justamente a eficácia e inocuidade das vacinas (Pereira, 2002). Mas passados quase 100 anos dos referidos protestos, ainda hoje estamos diante da dúvida, em relação à medicina veterinária, sob a correta indicação e o momento adequado do uso da prática de vacinação, sobretudo contra clostridioses. Principalmente pela inexistência de estudos epidemiológicos de prevalência, no Brasil, dos diferentes clostrídios que compõem as vacinas contra clostridioses comercializadas no país.

Os estudos realizados no Brasil como os conduzido por Lobato (1989) avaliando a qualidade de vacinas contra Botulismo, a avaliação das vacinas contra toxinas produzidas por *Clostridium perfringens* tipo C e tipo D realizada por Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000), a avaliação das vacinas contra *Clostridium sordellii* por Balsamão (2001), a avaliação das vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B, realizado no presente trabalho, têm demonstrado que em sua maioria as vacinas não induzem

respostas imunes adequadas para a prevenção das enfermidades a qual informam combater.

Ressalta-se que o controle oficial das vacinas contra Botulismo, implantado em julho de 1994, no Laboratório Regional de Apoio Animal, LARA MG, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento permitiu a implementação de ação oficial efetiva de avaliação deste imunógeno. Fato este, também registrado com o controle oficial de vacinas contra Carbúnculo Sintomático, pelo Laboratório Regional de Apoio Animal, LARA RS. Os controles citados permitiram e permitem maior rigor na garantia da qualidade das vacinas contra Botulismo e Carbúnculo Sintomático, comercializadas no Brasil, únicas vacinas contra clostridioses testadas oficialmente.

Mesmo sem a implantação do controle oficial de todos os componentes das vacinas contra clostridioses a Lei 8.078 (Brasil, 1990), consagrada como Código de Defesa do Consumidor, estabelece clara responsabilidade do fabricante. Destacamos:

- Art. 12: "O fabricante, o produtor, o construtor, nacional ou estrangeiro, e o importador respondem, independentemente da existência de culpa, pela reparação dos danos causados aos consumidores por defeitos recorrentes de projeto, fabricação, construção, montagem, fórmulas, manipulação, apresentação ou acondicionamento de seus produtos, bem como por informações insuficientes ou inadequadas sobre a sua utilização e riscos".

- Art. 18, parágrafo 6, "São produtos impróprios para uso e consumo:... inciso 3: os produtos, que por qualquer motivo, se revelem inadequados ao fim a que se destinam."

Estes produtos estão em desacordo, ainda, com a Portaria 301 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que estabeleceu as "Normas Complementares do Regulamento de Fiscalização de Produtos Veterinários e dos Estabelecimentos que os

Fabriquem e/ou Comerciem", (Brasil, 1996). Destacamos:

DO CONTROLE DE QUALIDADE

Art. 21 Todo produto veterinário deverá satisfazer aos seguintes requisitos de controle: ...

III - Dos produtos biológicos

a) toda partida de produto biológico deverá depois de fabricada e antes de sua comercialização, ser submetida conforme o caso, aos seguintes controles:

1. esterilidade; 2. pureza; 3. inocuidade; 4. eficácia; 4.1 sorologia; 4.2 potência/imunogenicidade"

Evidenciam-se, assim, pontos críticos no processo de controle de qualidade por parte dos laboratórios produtores de vacinas contra clostridioses ao não detectarem falhas nas vacinas enviadas para comercialização.

O rigoroso acompanhamento das diversas etapas de produção, desde o controle da matéria-prima utilizada até a obtenção do produto final e sua liberação para o comércio devem garantir produtos seguros e adequados ao fim a que se destinam de acordo com os princípios das boas práticas de fabricação.

CONCLUSÕES

As quatro amostras estudadas, utilizadas pelos laboratórios produtores de vacinas comerciais contra clostridioses produzidas no Brasil, foram confirmadas como *Clostridium novyi* tipo B.

Os métodos de controle avaliados neste estudo mostraram-se adequados, indicando sua aplicabilidade para o controle rotineiro de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B.

As partidas das vacinas analisadas neste estudo, contendo *Clostridium novyi* tipo B, mostraram-se, em sua maioria, ineficientes em produzirem resposta imunológica que atendessem aos níveis mínimos exigidos pela técnica oficial de controle.

Os resultados obtidos indicam a necessidade urgente de implantação do controle efetivo destes imunógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIMOTO, K., SASAKI, O., ISOGAI, M., KITAJIMA, T., OISHI, E., OKADA, N., YASUHARA, H., The Protective Effect of *Clostridium novyi* tipo B Alpha-Toxoid against Challenge with Spores in Guinea Pigs. *Jornal Veterinary Medicine Science*, v.60, n.6, p. 681-685, Kyoto, Japão. 1998.
- ARDEHALI, M., DARAKHSHAN, H., MOOSAWT, M., Production and Standardization of *Clostridium oedematiens* Vaccine in Iran. *Archive Institute Razi*, v.34-35, p. 23-26. Iran. 1984.
- ASSIS, R.A., DIAS, L.D., PARREIRAS, P.M., NASCIMENTO, R.A.P., MARTINS, N.E., LOBATO, F.C.F. Principais clostridioses dos ruminantes. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, Suplemento Técnico, v.7, n.22, 2001.
- AZEVEDO, E. O, LOBATO, F.C.F., ABREU, V.L., NASCIMENTO, R.A. Avaliação de Vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n.03, p. 239-242, 1998.
- BALDASSI, L. *Isolamento de bactérias do gênero Clostridium e detecção de toxina botulínica a partir de materiais obtidos de bovinos com suspeita clínica de botulismo*. 1986. 59f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
- BALL, D.W., VAN TASSELL, V., ROBERTS, M.D., HAHN, P. E., LYERLY, D. M., WILKINS, T. D. Purification and characterization of alpha-toxin produced by *Clostridium novyi* type A. *Infection and immunity*. p. 2912-2918, 1993.
- BALSAMÃO, G. M. *Teste de potência para Clostridium sordellii em vacinas comerciais contra clostridioses*. 2001. 25f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- BATTY, I., GLENNY, A.T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxins and antitoxin. *Br. Journal Pathology.*, V. 27. p. 110-126, 1947.
- BORRMANN, E., SCHULZE, F. Detection of *Clostridium novyi* type B alfa toxin by cell culture systems. *Immunology and medical Microbiology*, n.24, p.275-280, 1999.
- BRITISH PHARMACOPEIA (VETERINARY). *Veterinary Vaccines*. Department of Health and Social Security, Medicines Commission. Reino Unido. 1985.
- BRASIL. Lei nº 8.078, 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de setembro de 1990. Suplemento nº 176.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, 12 de maio de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 23, 18 de março de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 de março de 2002. Seção 1, p. 10-11.
- BROWN, K. K., PARIZEK, R. E., STEWART, R. C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*, December, p. 1717-1720, 1976.
- CARDELLA, M.A., DUFF, J.T., GOTTFRIED, C., BEGEL, J. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. *Bacteriological*, v.75, p.360-365, 1958.
- DURAN, C.O., WALTON, J.R. *Clostridium novyi* sudden death in sows: toxemia or post mortem invader?. *The Pig Journal - Proceedings section*, v.39, p.37-53, 1997.

- EICHEL-STREIBER, C. V., BOQUET, P., SAUERBORN M., THELESTAM, M. Large clostridial cytotoxins – a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in microbiology Reviews*, v. 4, n.10, p.375-382.
- ESTADOS UNIDOS. *Code of Federal Regulations*. Washington: office of the Federal Register National Archives and Record Administration, sec. 113.108, v.1, 2002. *Clostridium novyi* bacterin-toxoid. Disponível em: <http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/janqtr/9cfr113.108.htm>. Acesso em 17 de julho de 2002.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines 3.ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.
- HARBOLA, P. C., VERMA, J. G. immunogenic response to *Clostridium novyi* type B toxóide in guinea pigs and sheep. *Indian Veterinary Journal*, n.65, p. 658-660, 1988.
- HATHEWAL, C.L. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- JANSEN, B.C. The beta toxin of *Clostridium welchii* type B, Wildson, in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 28, n.4, p. 495-549, 1961.
- KERRY, J. B., CRAIG, G.R. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. *Veterinary Record*, v.105, p.551-554, 1979.
- KOLBE, D.R., HAUER, P.J. Media and Reagents used to cultivate and identify obligately anaerobic bacteria. Center for Veterinary Biologics-Laboratory. Ames: APHIS, 1995.
- KOLBE, D.R., CLAUS, K D; NERVIG, R M. A method for the production of *Clostridium haemolyticum* spores on solid medium. *Journal of biological Standardization*, v.9, p.115-119, 1981.
- LOBATO, F. C. F. *Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil*. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- LOBATO F.C.F., MORO, E., UMEHARA, O., ASSIS, R. A., MARTINS, N.E., GONÇALVES, L.C.B., *Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.4. Belo Horizonte. 2000.
- LOBATO, F.C.F., ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, v.19, n.113, 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.
- Manual de Produtos Veterinários 2001-2002. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Veterinários, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. São Paulo: Robe Editorial, 2001. 970p.
- NEVES, R D. *Aplicação de um método de produção de esporos de Clostridium haemolyticum na avaliação da eficácia da vacina contra hemoglobinúria bacilar*. 1997. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- OAKS, J.L., KANALY, S.T., FISHER, T.J., BESSER, T. E. Apparent *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* infection and exotoxemia in two horses. *Journal Veterinary Diagnostic*, v.9, p. 324-325, 1997.

OIE, Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Principles of Veterinary Vaccine Production. Paris. 2000. 957p.

PEREIRA, L. A. M. *As barricadas da saúde*. 1. ed. São Paulo: Fundação Perseu Abramo, 2002. 126p.

PIETRZYKOWSKI, E., COX, J., ZACHARIOU, M., MACGREGOR, A. Development of enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium novyi* type B alpha toxin. *Biologicals*, n.19, p. 293-298, 1991.

REED, L J; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal Hyg.*, v.27, n.3, p. 493-497, 1938.

ROBLES, C.A., KERBAGE, O.K., MOREIRA, A.R. Hepatitis Infecciosa Necrosante en ovinos Merino de la Patagonia Argentina, parasitados con *Thyranosoma actinioides*. *Archivos de Medicina Veterinária*, v.32, n.1. Valdivia. 2000.

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. *Clostridium* spp. In: The pathogenic Anaerobic Bacteria. 3.ed. Illinois: Springfield, 1984. 550p.

STERNE, M., BATTY, I. Clostridios Patógenos. Zaragoza: Acribia, 1978. 135p.

SWEENEY, H.J., GREIG, A. Infectious necrotic hepatitis in a horse. *Equine Veterinary Journal*, v.18, n.2, p.150-151, 1986.

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. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.4, p.112-114, 1985.

WOOD, K.R. An alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency testing of the *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* type B and *Clostridium perfringens* type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals*, n. 19, p. 281-286, 1991.

UZAL, F.A., OLAECHEA, F.V., VANNELLI, S.A., Un caso de hepatitis infecciosa necrosante en oveja sin Fasciola hepática. *Revista de Medicina Veterinária*, v.77, n.5, p. 377-379, Buenos Aires. 1996.

ANEXOS

Anexo I: Protocolo de Titulação da alfa toxina

Etapa 1 - Titulação da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, para utilização nos testes sorológicos em Dose Mínima Mortal por mililitro.

Diluição	Pura	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Toxina (mL)	1,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Diluyente (mL)	---	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Solução toxina + diluyente (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Diluyente (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume total (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Etapa 2 - Titulação da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758: determinação "end-point". A partir da última diluição (etapa 1) em que ocorreram morte de 100% dos camundongos inoculados.

Diluição	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8	1/9
Toxina (mL)	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Diluyente (mL)	---	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Solução toxina + diluyente (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Diluyente (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume total (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Anexo II: Protocolo de Padronização da alfa toxina

Etapa 1 - Padronização da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758, para utilização nos testes sorológicos em Dose Mínima Mortal por mililitro.

Diluição	Pura	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Toxina (mL)	1,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Diluyente (mL)	---	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Solução toxina + diluyente (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antitoxina 0,1 UI/mL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume total (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Volumes de alfa toxina e antitoxina homóloga utilizada na determinação da dose teste.

Etapa 2 - Padronização da alfa toxina de *Clostridium novyi* tipo B, ATCC 25758: determinação da dose teste. A partir da última diluição, etapa 1, em que ocorreram morte de 80% dos camundongos inoculados.

Antitoxina (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Toxina (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Diluyente (mL)	---	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9
Volume total (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

A dose teste foi determinada a partir da última diluição, etapa 2, em que ocorreu morte de no mínimo 80% dos camundongos inoculados.