

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



AVALIAÇÃO DE IMUNÓGENOS ANTIBOTULÍNICOS EM USO NO BRASIL

Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
Minas Gerais
1989

Francisco Carlos Faria Lobato

T 636.019 17

2.150
1989



AVALIAÇÃO DE IMUNÓGENOS ANTIBOTULÍNICOS EM USO NO BRASIL

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

Área: Epidemiologia

Belo Horizonte

Minas Gerais

1989

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000005259001000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

103/04
- 26

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

26/03/90

52590-01

636.089 693 15

L796a Lobato, Francisco Carlos Faria, 19

Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil./Francisco Carlos Faria Lobato.— Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 1989.

p. : il.—

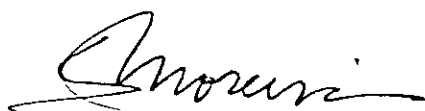
Tese (mestrado)

1. Botulismo- Aspectos imunológicos. 2. Botulismo- Vacinas - Brasil. I. Título.

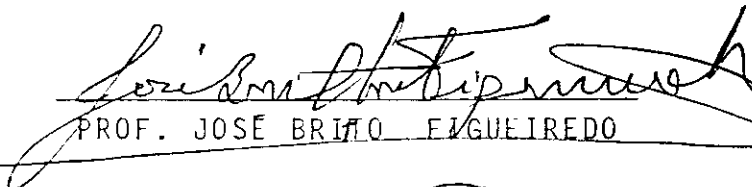
Aprovada em: 15/12/1989.



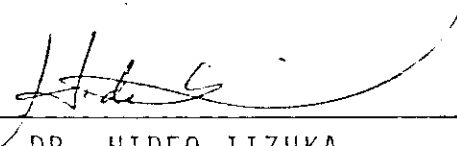
PROF. NIVALDO DA SILVA
Orientador



PROF. ÉLVIO CARLOS MOREIRA



PROF. JOSÉ BRITO FIGUEIREDO



DR. HIDEO IIZUKA



DR. JEROME LANGENEGGER

A memória de meu pai,
Edison Lobato

À minha esposa Bernadete, à
minha mãe, Vera, e às minhas
filhas, Juliana e Mariana, de
dico este trabalho.

O autor agradece a todos aqueles que, direta ou indiretamente, lhe prestaram seu estímulo imprescindível e sua valiosa colaboração.



O presente trabalho contou com o apoio do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA), que permitiu a utilização de suas instalações, e com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da EMBRAPA-PNP-Saúde Animal e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEPE-MVZ).



RESUMO

Foram avaliados os imunógenos antitoxinogênicos bivalentes C e D dos quatro laboratórios que produzem vacinas no país, quanto à esterilidade, à inocuidade e à eficiência. As vacinas semeadas em meios mantidos em aerobiose e anaerobiose mostraram-se estéreis. No teste de inocuidade em camundongos e cobaias os produtos também se revelaram inócuos, com exceção de uma partida que provocou a morte em cobaias com manifestações clínicas de botulismo. A eficiência foi avaliada através de testes de desafio, soro proteção e soroneutralização em camundongos, cobaias e bovinos vacinados. Apenas duas das oito partidas testadas conferiram proteção a camundongos inoculados com vacina não diluída, uma contra a Toxina D, quando desafiado com 500 DL₅₀. Camundongos que receberam vacina diluída não apresentaram níveis de proteção. Nenhum dos produtos testados, conferiu níveis, mínimos de antitoxinas C e D, em cobaias inoculados com vacina não diluída. Os soros dos bovinos vacinados com as vacinas que indicaram proteção em camundongos, foram titulados por soroneutralização em camundongos mensalmente durante 12 meses pós-vacinação, verificando-se a presença de baixos níveis de antitoxinas séricas [$< 0,1$ unidade internacional por mililitro (U.I/ml) para o Tipo C e $0,5$ U.I/ml para o Tipo D] e apenas transitoriamente após a vacinação de reforço. Conclui-se que as vacinas não atendem satisfatoriamente as exigências

mínimas para a imunização dos bovinos.



SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. LITERATURA CONSULTADA.....	04
2.1. Métodos de produção e eficiência das vacinas....	04
2.2. Testes de eficiência.....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local do trabalho.....	15
3.2. Aquisição e identificação das vacinas.....	15
3.3. Animais de experimentação.....	16
3.4. Amostras utilizadas.....	16
3.5. Meios de cultura.....	16
3.7. Conservação das amostras.....	18
3.8. Titulação das toxinas.....	18
3.9. Toxinotipia.....	18
3.10. Determinação da dose-teste.....	19
3.11. Provas de controle.....	20
3.11.1. Testes de esterilidade.....	20
3.11.2. Testes de inocuidade.....	20
3.11.3. Níveis de adjuvantes.....	21
3.11.4. Testes de potência em camundongos.....	21

3.11.4.1. Imunização com vacina não diluída em dose única e desafio aos 21 e aos 35 dias após a vacinação	21
3.11.4.2. Imunização com vacina não diluída em duas doses.....	22
3.11.4.3. Imunização com vacina diluída.	22
3.11.5. Teste de potência em cobaias.....	23
3.11.6. Teste de potência em bovinos.....	24
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Produção e titulação de toxina.....	26
4.2. Toxinotipia.....	27
4.3. Determinação da dose teste.....	27
4.4. Provas de controle.....	28
4.4.1. Esterilidade.....	28
4.4.2. Inocuidade.....	28
4.4.3. Concentração de adjuvantes.....	29
4.5. Testes de proteção.....	31
4.5.1. Testes de potência das vacinas em camundongos.....	31
4.5.1.1. Camundongos inoculados com vacina integral.....	31
4.5.1.2. Camundongos inoculados com vacina diluída.....	32
4.5.2. Teste de potência das vacinas em cobaias.	34
4.5.3. Teste de potência das vacinas em bovinos.	35
4.5.3.1. Teste de soroproteção.....	35
4.5.3.2. Titulação do soro dos bovinos imunizados.....	36
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55



LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Determinação da DL ₅₀ , em camundongos da toxina botulínica tipo C produzida nos meios de CARDELLA et alii (1958) e WRIGHT (1933).	39
TABELA II - Determinação da DL ₅₀ em camundongos da toxina botulínica tipo D produzida nos meios de CARDELLA et alii (1958) e WRIGHT (1933)..	40
TABELA III - Toxinotipia das amostras de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D usados como padrão.....	41
TABELA IV - Determinação da dose-teste (L+/10) da toxina botulínica tipo C usada como padrão.....	42
TABELA V - Determinação da dose-teste (L+/10) da toxina botulínica tipo D usada como padrão...	43
TABELA VI - Concentração de hidróxido de alumínio [Al(OH) ₃] e fosfato de alumínio (AlPO ₄) usados como adjuvantes nas vacinas antibotulínicas testadas.....	44
TABELA VII - Teste de potência em camundongos inoculados com a vacina Z-1 através do desafio com doses crescentes de toxinas botulínicas tipos C e D	45

TABELA VIII	-	Teste de potência em camundongos inoculados com a vacina W-1 através do desafio com doses crescentes de toxinas botulínicas tipo C e D.....	46
TABELA IX	-	Teste de potência em camundongos inoculados com dose única de vacina diluída, através do desafio com dose constante de toxina botulínica tipo C.....	47
TABELA X	-	Teste de potência em camundongos inoculados com dose única de vacina diluída, através do desafio com dose constante de toxina botulínica tipo D.....	48
TABELA XI	-	Níveis de antitoxinas C e D em "pool" de soros de cobaias na quarta e sexta semana após vacinação com toxóides bivalentes com dose única e com reforço.....	49
TABELA XII	-	Soro-proteção em camundongos inoculados com a mistura toxina C mais "pool" de soro de bovinos vacinado com toxóides botulínicos bivalentes C e D, colhidos a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação.....	50
TABELA XIII	-	Soro-proteção em camundongos inoculados com a mistura toxina D mais "pool" de soro de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D, colhidos a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação.....	51
TABELA XIV	-	Resposta de antitoxina C e D em "pool" de soro de bovinos imunizados com a vacina Y-1 a partir da 2ª a 52ª semana após a vacinação.	52
TABELA XV	-	Resposta de antitoxina C e D em "pool" de bovinos imunizados com a vacina Z-1 a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação.	53



1. INTRODUÇÃO

O Botulismo é enfermidade que acomete o homem e os animais e é resultante da ação das toxinas produzidas pelo *Clostridium botulinum*. O agente etiológico e o quadro evolutivo da doença foram descritos e caracterizados, pela primeira vez, por VAN EMERGEN (1897) citado por SOUZA (1985), que denominou esse agente de *Bacillus botulinus*.

Posteriormente, novas amostras foram isoladas, e HOLLAND (1918), citado por HIGASHI et alii (1978-79), classificou tais bacilos no gênero *Clostridium*.

Atualmente, são conhecidos sete tipos antigenicamente diferentes de *Clostridium botulinum*, de A até G, sendo o tipo C subdividido em C α (BENGSTON, 1922) e C β (SEDDON, 1922). O botulismo nos bovinos está associado, principalmente, às toxinas produzidas pelos tipos C e D (SIMMONS & TAMMEMAGY, 1964; TOKARNIA et alii, 1970; SMITH, 1977). Nessa espécie, a primeira descrição da doença foi feita por THEILER (1920), na África do Sul, e a partir daí, novos surtos foram descritos em diversos países sendo considerada cosmopolita (ACHA & SZYFRES, 1986). Entretanto, epizootias têm sido descritas, sobretudo em regiões de solos deficientes em fósforo, que, em associação com a acentuada presença de esporos na terra e no trato digestivo dos animais, oferecem condições para o aparecimento de surtos.

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência da doen-

ça foi feito por TOKARNIA et alii (1970), no estado do Piauí. Posteriormente, novos surtos foram descritos por LANGENNEGGER et alii (1983), nas regiões de cerrado dos estados de Goiás e Minas Gerais. Segundo esses autores, a ocorrência da doença é atribuída às mudanças no tipo de exploração pecuária, através da introdução de raças mais precoces, e à formação de pastagens artificiais em solos com teores de fósforo insuficientes para suprir as exigências dos animais, principalmente das fêmeas gestantes ou em lactação. Quando procuram suprir suas deficiências através da ingestão de ossos e tecidos em decomposição, os animais ingerem a toxina formada nas carcaças, desencadeando-se, então, novos surtos.

Nos países onde a doença representa risco para os rebanhos, adotam-se medidas profiláticas através da imunização dos animais, com vacinas monovalentes ou bivalentes C e D, associada à suplementação mineral e à retirada das fontes de contaminação das pastagens. Entretanto, nos sistemas de criação extensivos, a vacinação constitui-se no principal mecanismo de prevenção (HENNING, 1956; TAMMEMAGY & GRANT, 1967; JANSEY et alii, 1976; GIELLESPIE & TIMONEY, 1981).

As primeiras vacinas empregadas no controle da doença foram desenvolvidas por BENNETS & HALL (1938) e por MANSON & STERNE (1938), na Austrália e África do Sul, respectivamente. Esses imunógenos eram preparados a partir do crescimento de amostras de *Clostridium botulinum* em meios de cultura que continham proteína animal como fonte nutriente. Assim produzidos, conferiam boa proteção aos animais imunizados quando se empregava um esquema prolongado de vacinação, com grandes volumes de vacina. Com o desenvolvimento de novas técnicas, que permitiram a obtenção de toxinas mais concentradas e a incorporação de adjuvantes, as vacinas tornaram-se mais imunogênicas, possibilitando a adoção de esquema de vacinação reduzido, com volumes menores.

No Brasil, a comercialização de vacinas antitoxinicas bivalentes C e D se deu a partir de 1980, sendo que, no

Último quinquênio, ocorreu um crescimento significativo na produção desses imunógenos. De acordo com os dados fornecidos por OLIVEIRA (1989)*, a produção passou de 5.000.000 doses, em 1984, para cerca de 15.000.000 de doses, em 1988. Atualmente, quatro laboratórios respondem por essa produção, três localizados na Região Sudeste e um no Nordeste do País.

Tendo em vista a crescente utilização da vacina como um dos mecanismos de combate da doença e a inexistência de um controle oficial que ateste a qualidade dos imunógenos empregados, o estudo aqui apresentado teve por objetivo avaliar esses produtos quanto à esterilidade, à inocuidade e, principalmente, quanto à eficiência, através dos níveis de anticorpos humorais em bovinos inoculados e de ensaios em animais de laboratório.

No trabalho, procurou-se avaliar os imunógenos em face de testes empregados em outros países, com o objetivo de fornecer subsídios para a implantação de programas de controle da produção no Brasil.

* OLIVEIRA, M.A.R. Demonstrativo da produção de vacinas anti-botulínicas (DIPROD) no Brasil. (Comunicação Pessoal) 1989. (Ministério da Agricultura - Divisão de Produtos Veterinários). Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo Ala A. Brasília, DF, CEP: 70043):



2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Métodos de produção

BENNETS & HALL (1938) prepararam uma vacina antituberculínica tipo C, contendo pequena proporção do tipo D, através do crescimento das amostras em meio *V.F.*, com caldo de carne. O toxóide era preparado pela adição de 0,8% de formalina ao filtrado tóxico e incubado a 37°C. Após a inativação, os antígenos eram adsorvidos em 0,6% de fosfato de alumínio. A vacina foi testada em ovinos e bovinos, que receberam uma dose de 1 ml e outra de 5 ml após 60 dias. Os animais assim imunizados apresentaram alto grau de proteção.

MANSON et alii (1938) produziram vacinas antituberculínicas monovalentes C e D, a partir do cultivo das amostras em meio de cultura contendo partículas de carne de equino com 2% de soro, incubado a 37°C, por cinco dias. O toxóide foi preparado a partir do filtrado tóxico inativado com 0,5% de formalina comercial. As vacinas foram empregadas em bovinos, observando-se o esquema de imunização que se segue:

1) Esquema primário:

Toxóide D - 1ª dia = 10 ml, em aplicação subcutânea;
3ª semana = 10 ml, em aplicação subcutânea;

5ª semana = 10 ml, em aplicação subcutânea;
Toxóide C - 8ª semana = 10 ml, em aplicação subcutânea;
11ª semana = 10 ml, em aplicação subcutânea.

2) Doses subsequentes:

Inicialmente, reforço anual com 10 ml de cada toxóide; posteriormente, o esquema foi modificado para 5 ml a cada seis meses.

Com a utilização desse esquema de imunização, a incidência de botulismo em bovinos foi reduzida a níveis insignificantes.

POLSON & STERNE (1946) desenvolveram, na África do Sul, a produção de toxóide botulínico tipo D, através do crescimento das amostras em celofane, contendo salina, imerso em meio nutriente à base de partículas de carne. A toxina produzida apresentou altos títulos tóxicos, da ordem de 1×10^8 doses mínimas letais (DML*/ml). O filtrado obtido era inativado, num período de sete a 10 dias, com 0,5% de formalina comercial, enquanto os filtrados obtidos pelo método convencional necessitavam de três semanas e do emprego de 0,8% de formalina. Cobaios imunizados com 1/40 ml do novo toxóide, após 30 dias, apresentavam títulos de 80 unidades no soro, título este quatro vezes superior aos obtidos em cobaios vacinados com 0,5 ml de toxóide produzidos pelo método convencional.

STERNE & WENTZEL (1950) prepararam, na África do Sul, toxóide botulínico bivalente C e D, a partir do crescimento das amostras em tubo de celofane, contendo salina, imerso em caldo nutriente à base de milho (*Corn steep liquor*). As toxinas produzidas por esse método eram cerca de 50 a 100 vezes mais potentes que as produzidas pelo método convencional. A inativa-

* DML - É a menor concentração de toxina capaz de matar 100% do lote de camundongos inoculados, no prazo de até 96 horas.

ção dessas toxinas era feita com 0,4% de formalina, em um período de seis a oito dias de incubação a 37°C, para o tipo C, e de 15 a 21 dias, para o tipo D. Após a inativação, o toxóide era adsorvido em fosfato de alumínio (15 mg/ml) e sua antigenicidade avaliada em cobaios e bovinos. O toxóide preparado a partir de toxinas dialisadas demonstrou ser cerca de 8.000 vezes mais eficientes que o produzido pelo método convencional.

NIGG et alii (1947) desenvolveram um meio de cultura para produção de toxinas botulínicas tipos A e B, inativadas e adsorvidas pelo alúmen. Esses autores compararam a toxicidade de ambas as toxinas em camundongos e cobaios e concluíram que a toxina A apresentou título de 4×10^5 DML/ml em camundongos e de 20 g e 4×10^4 DML/ml em cobaios, ocorrendo o inverso com a do tipo B. De acordo com os pesquisadores, o processo de inativação das toxinas era primeiramente observado em camundongos. Conseqüentemente, esses animais eram empregados primeiramente e, após o processo de inativação ter-se completado nessa espécie, inoculavam-se cobaios. Após completa inativação, o toxóide era precipitado pelo alúmen e sua antigenicidade avaliada em camundongos imunizados com vacina diluída e desafiados com 0,5 ml de toxina nas doses de 15 a 40 DL₅₀, verificando-se proteção dos animais imunizados com vacina nas diluições de 1:5 a 1:84.

LARSEN et alii (1955) desenvolveram um toxóide botulínico tipo C, usado na vacinação de martas, empregando técnica similar à descrita por STERNE & WENTZEL (1950) e observaram que:

- 1) altos níveis de toxina eram obtidos por esse método;

- 2) os animais imunizados com o toxóide precipitado pelo alúmen resistiram ao desafio de até 1×10^4 DML por via oral.

BELL et alii (1957) produziram toxóide botulínico trivalente A, B e C, também empregado na imunização de martas, através do cultivo das amostras em membrana de diálise, imerso

em meio nutriente. As toxinas obtidas eram tratadas com formalina na concentração final de 0,5% e, após a inativação precipitadas com potássio de alumínio. Os animais imunizados resistiram ao desafio, enquanto os de controle morreram em 24 horas.

CARDELLA et alii (1958) empregaram um meio para produção de toxina tipo C, contendo 4% de proteose de peptona, 2% de N-Z amine tipo B, 2% de extrato de levedura e 1% de glicose. As culturas eram semeadas e incubadas, a 33°C, por cinco dias e apresentaram títulos de $0,8 \times 10^6$ DL₅₀ por mililitro. As toxinas assim produzidas eram purificadas por precipitação com álcool ou sulfato de amônia e convertidas em toxoide na presença de 0,6% de formalina. O toxoide era adsorvido com fosfato de alumínio (7 mg/ml) e mostrou-se altamente antigênico em camundongos e cobaias.

CARDELLA et alii (1960), usando técnica similar à descrita por STERNE & WENTZEL (1950), produziram toxoide botulínico tipo D a partir da toxina purificada por precipitação com álcool e extração com cloreto de cálcio. A toxina era convertida em toxoide na presença de 0,6% de formalina a 33°C e adsorvida em fosfato de alumínio (7 mg/ml). Mostrou-se altamente antigênica em camundongos, cobaias e coelhos.

WRIGHT et alii (1960) produziram toxoide botulínico tipo A e B para a imunização de seres humanos. Toxinas purificadas eram convertidas em toxoide com pH 5,5 e a 35°C, na presença de 0,6% de formalina. No processo de inativação, os autores observaram que as toxinas eram, inicialmente, mais tóxicas para camundongos do que para cobaias e que a inativação, para os primeiros, ocorria mais rapidamente do que para os segundos. Após adsorção em fosfato de alumínio, os toxoides mostraram-se antigênicos em camundongos, cobaias e coelhos.

BOWMER (1963) estabeleceu o padrão internacional das antitoxinas botulínicas tipos A, B, C, D e E, em unidades internacionais. Esse padrão é definido como a atividade específica contida em cada tipo de antitoxina liofilizada e de peso conhecido: Tipo A- 0,1360 mg; Tipo B- 0,17 mg; Tipo C- 0,800 mg;

Tipo D- 0,0121 mg e Tipo E- 0,69i mg. As antitoxinas A e B se comportam como soros monoespecíficos, enquanto as antitoxinas C, D e E, em certas condições experimentais, apresentam reações cruzadas; estas, no entanto, são monoespecíficas quando se emprega a dose de teste recomendada. O autor relata detalhes da produção de toxinas e de toxóides botulínicos; descreve, ainda, os meios de cultura apropriados para produção de cada tipo de toxina e as técnicas para a produção de toxóides mais antigênicos.

HEPPLE (1967) avaliou o emprego do hidróxido de alumínio como adjuvante nas vacinas contra as clostridioses e observou que:

1) o melhor pH para adsorção de antígeno pelo hidróxido de alumínio era entre 6,1 e 6,4;

2) a temperatura ideal para adsorção estava entre 12°C e 20°C;

3) a concentração ideal para adsorção era de 6 mg hidróxido de alumínio por mililitro;

4) ocorria variação na adsorção do antígeno entre os diversos tipos de hidróxido de alumínio testados.

OLIVEIRA (1972) produziu anatoxina botulínica tipo A, empregada na hiperimunização de cavalos para obtenção de soro antibotulínico. Na produção da anatoxina, o autor avaliou diversos meios de cultura para produção de toxina, bem como o período de incubação em que ocorria a toxigênese máxima das amostras empregadas. Na inativação das toxinas, empregou diversas concentrações de formol e concluiu que, com o uso de 0,5% de formalina, a inativação ocorria em um período variável de 20 a 25 dias, dependendo do título da toxina empregada. Cobaios imunizados com as anatoxinas advindas de toxinas inativadas com essa concentração de formol apresentavam níveis de anticorpos superiores aos cobaios imunizados com anatoxinas em que se empregaram concentrações mais elevadas. Essa anatoxina foi inoculada em cavalos e, após a hiperimunização, obtiveram-se plas

mas com títulos neutralizantes de 160 U.I./ml. Após purificação, esses títulos elevaram-se para 1400 U.I./ml.

2.2. Testes de eficiência

MANSON et alii (1938) avaliaram a antigenicidade de toxóides botulínicos monovalentes C e D, empregando o teste de soroproteção em camundongos e usando toxinas C e D em DML, que eram neutralizadas por 0,1 ml de soro de bovinos imunizados. Observaram que 0,1 ml de soro neutralizava doses superiores a 5 DML de ambas as toxinas nos animais que receberam três doses de cada toxóide.

HOTTLE et alii (1947) testaram diversos métodos para a avaliação de toxóides botulínicos tipos A e B, através da imunização de cobaios e camundongos, observando que:

1) cobaios imunizados com toxóide adsorvido em alúmen resistiram ao desafio de até 1×10^6 DML; entretanto, a acuidade do método de avaliação era limitada pela variação na resposta de cada animal, bem como pelo pequeno número de animais empregados no teste de cada toxóide;

2) camundongos imunizados com vacina integral e com diluições duplicadas da vacina, quando desafiados, resistiram à dose de 4×10^4 DL₅₀ com a vacina integral e os animais imunizados com a vacina na diluição 1:14 resistiram à dose de prova de 32 DL₅₀ — em ambos os métodos, o nível de proteção foi determinado em 50% de sobrevivência ao desafio, segundo RED & MUENCH (1938);

3) existia uma marcada diferença na resposta antigênica de camundongos vacinados com vacina sem adjuvante e precipitada pelo alúmen — o uso de vacina sem adjuvante resultava uma baixa resposta;

4) cobaios apresentavam uma mesma resposta quando imunizados com vacina sem adjuvante ou precipitada pelo alúmen.

STERNE & WENTZEL (1950) avaliaram a antigenicidade dos toxóides botulínicos bivalentes C e D em cobaios e bovinos. Os cobaios imunizados apresentaram, quatro semanas após a vacinação, níveis superiores a 80 unidades de antitoxinas C e D por mililitro de soro. Já os bovinos apresentaram níveis que variaram de 0,5 a 2,0 unidades, seis semanas após a primeira dose; mas, 12 dias depois da dose de reforço, os níveis foram superiores a 500 unidades de antitoxinas C e D por mililitro de soro.

APPLETON & WHITE (1957), ao avaliarem a antigenicidade do toxóide botulínico tipo C em camundongos, observaram que:

1) camundongos imunizados pela via subcutânea ou intraperitoneal apresentaram resposta similar ao toxóide;

2) a resposta em camundongos imunizados com uma ou duas doses de vacina era, praticamente, a mesma quando desafiados 14 ou 21 dias após a vacinação;

3) camundongos imunizados com toxóide diluído, produzido a partir de toxina dialisada, apresentavam proteção acima de 75% ao desafio com 32 DL₅₀, mesmo quando imunizados com uma única dose de vacina diluída a 1:10; o mesmo experimento com toxóide produzido a partir de toxina não-dialisada resultou na morte de todos os animais desafiados;

4) camundongos imunizados com uma única dose de 0,5 ml de toxóide integral resistiram ao desafio de até $4,22 \times 10^4$ DL₅₀, 21 dias após a vacinação;

5) a melhor resposta apresentada pelos animais, quando imunizados com uma ou duas vacinações, foi com a dose de 0,5 ml do toxóide.

CARDELLA et alii (1958 e 1960), na avaliação de toxóides botulínicos tipos C e D, produzidos a partir de toxinas purificadas, constataram que:

1) camundongos imunizados com 1 ml do toxóide, por via subcutânea, e desafiados 35 dias após a vacinação foram pro

tegidos contra a dose de prova de até $1,1 \times 10^6$ DL₅₀, para o tipo C, e de $1,0 \times 10^5$ DL₅₀, para o tipo D;

2) cobaios imunizados com 1 ml do toxóide apresentaram níveis de antitoxina no soro superiores a 8 U.I./ml, para o tipo D, quando sangrados a partir da nona semana após a vacinação;

3) a resposta imune em camundongos era melhor quando se utilizava toxóide adsorvido em fosfato de alumínio, enquanto, em cobaios, a resposta era a mesma com toxóide com ou sem adjuvante.

TAMMEMAGY & GRANT (1967) também avaliaram a proteção conferida a bovinos imunizados com uma ou duas doses de toxóide botulínico bivalente C e D. A antigenicidade foi determinada através da soroproteção em camundongos e do desafio com toxina D de animais imunizados. No teste de soroproteção, camundongos foram inoculados com uma mistura contendo 0,1 ml de soro e 0,25 ml de toxina D, com uma dose mínima letal (DML). Através deste teste, os autores observaram que níveis de antitoxina eram detectáveis a partir da terceira semana após a vacinação e mantidos por um período superior a 12 meses. Como nenhum dos animais imunizados com o toxóide bivalente desenvolveu sinais de intoxicação, quando desafiado com a dose de 22,5 DL₅₀/kg/via oral, os autores concluíram que bovinos imunizados com toxóide botulínico bivalente C e D, com uma ou duas doses, mantinham-se imunes à toxina D por um período superior a 24 meses.

PRANTER (1975) testou, comparativamente, a potência de vacinas contra toxina botulínica tipo C em camundongos, cobaios e martas, empregando técnicas usadas nos países escandinavos, nos Estados Unidos da América e no Reino-Unido. Chegou às seguintes conclusões:

1) A vacina testada de acordo com a técnica empregada na Escandinávia – camundongos de 14 a 16 g eram imunizados com a dose de 0,2 ml de vacina em diluições duplicadas (1:1, 1:4,

1:8), mantendo-se constante a concentração de adjuvantes da vacina original; após 21 dias, os animais de cada grupo eram desafiados, por via intraperitoneal, com 10 DL₁₀₀ (25 DL₅₀) de toxina C; a potência da vacina era avaliada pela sobrevivência de 80% dos animais imunizados com as diluições 1:2, 1:4 e de 50% na diluição 1:8 – mostrou-se altamente eficiente, cumprindo as taxas de sobrevivência em todas as diluições requeridas no teste.

2) A técnica empregada nos Estados Unidos – ratas de 900 g eram inoculadas com 1 ml do toxóide e desafiadas, após 25 dias, com 1×10^4 DL₅₀ de toxina C, por via oral, e a potência avaliada pela sobrevivência de 80% dos animais imunizados – também foi eficiente na avaliação do toxóide testado, protegendo 100% dos animais imunizados.

3) No teste empregado no Reino Unido – cobaias de 400 g eram imunizados com a dose mínima recomendada pelo fabricante da vacina e, após 26 dias, eram sangrados; determinado o nível de antitoxina no soro, através da soroneutralização em camundongos, exigiam-se níveis mínimos de 5 U.I. e 1 U.I. por mililitro de soro, para os tipos C e D, respectivamente – a vacina em teste não cumpriu os requisitos. Entretanto, revacinando-se os animais 21 dias após a primeira dose e dosando-se o soro 10 dias depois, os níveis de antitoxina foram de 6,5 U.I./ml, atendendo às exigências do padrão.

A partir dos resultados encontrados, o autor sugeriu que os modelos de teste que empregavam o desafio de animais imunizados, como avaliação da potência do imunógeno, eram mais seguros do que os modelos que adotavam o nível de antitoxina no soro e que havia necessidade de novos experimentos para se correlacionar o título humoral de antitoxina dos animais imunizados com os modelos que utilizavam o desafio com toxina.

JANSEN et alii (1976) compararam a resposta de bovinos imunizados com toxóides botulínicos bivalentes C e D, adsorvido em fosfato de alumínio e em emulsão oleosa, através

da determinação do nível de antitoxina no soro dos animais inoculados, empregando a soroneutralização em camundongos. Os autores observaram que os animais imunizados com vacina adsorvida em fosfato de alumínio sã apresentaram níveis de antitoxina duas semanas apõs a dose de reforço. Esses níveis variavam, a partir da segunda até a décima semana, de 10 a 0,5 U.I./ml, para o tipo D, e de 2,0 U.I./ml até níveis não-detectáveis, para o tipo C. Nos animais que receberam a vacina em emulsão oleosa, os níveis de antitoxina foram detectados, a partir da quarta semana apõs o estímulo primário. Depois da inoculação da dose de reforço, observaram-se, no soro dos animais, níveis superiores a 20 U.I./ml, para o tipo C, e a 100 U.I./ml, para o tipo D, sendo que os níveis de antitoxina foram ainda detectados até quinta semana apõs o reforço. A partir desses resultados, os autores concluíram que a vacina em emulsão oleosa, por ser mais antigênica, poderia ser empregada como estímulo primário na imunização de animais jovens e que, nas vacinações subseqüentes, deveriam ser utilizadas vacinas adsorvidas pelo alumínio.

MATHEWS (1976) avaliou, experimentalmente, a resposta antigênica de cobaios vacinados com toxóides botulínicos bivalentes e monovalentes C e D, com uma única dose, segundo técnica descrita pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970). Observou que os níveis de antitoxina, quando determinados na quarta semana apõs a vacinação, não cumpriam os requisitos mínimos exigidos pelo teste; entretanto, esses níveis eram incrementados quando avaliados na sexta e na nona semanas apõs a vacinação, atingindo níveis médios de 8 a 5 U.I./ml de soro para os tipos C e D, respectivamente. O aumento do nível de antitoxina, a partir da oitava semana apõs a vacinação, também foi observado em bovinos imunizados com toxóide C. Em outro experimento, o autor constatou a interferência entre os antígenos C e D, na resposta humoral para cada tipo sorológico, nos animais imunizados com a vacina bivalente. Esse efeito, no entanto é relativamente pequeno quando comparado aos erros existentes na determinação da potência e à dificuldade de se formular uma vacina

bivalente com proporções ótimas desses antígenos. Com os resultados obtidos nos testes em cobaias para a avaliação da potência dos imunógenos, o autor sugeriu não só a necessidade de reavaliação do modelo empregado, principalmente quanto ao período da determinação dos níveis de antitoxina - a partir da sexta semana, ocorre o *pico* na produção de anticorpos, como também a necessidade de se estabelecer uma referência internacional para a preparação de vacinas bivalentes, através de estudos com ensaios correlatos.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do trabalho

Os trabalhos foram desenvolvidos, inicialmente, no Laboratório de Doenças Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo concluídas nas dependências do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA), do Ministério da Agricultura, em Pedro Leopoldo e em uma propriedade rural do Município de Matozinhos, Minas Gerais.

3.2. Aquisição e identificação das vacinas

Para efeito de avaliação, vacinas de cada laboratório produtor foram adquiridas, ao acaso, no comércio, observado o período de validade de cada uma, e conservadas de acordo com as especificações do fabricante.

Os laboratórios produtores das vacinas testadas foram codificados com letras. As vacinas foram identificadas por número precedidas pelo código do laboratório.

Na realização dos testes, utilizaram-se as seguintes vacinas e partidas:

Laboratório	Produtor	Partidas
X		X-1
Y		Y-1, Y-2
Z		Z-1, Z-2, Z-3
W		W-1, W-2



3.3. Animais de experimentação

Para observação dos efeitos das vacinas testadas, foram utilizados os seguintes animais:

1) camundongos albinos da raça Swiss, linhagem Webster, de ambos os sexos, pesando entre 14 e 22 g, cedidos pelo biotério do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA), do Ministério da Agricultura, de Porto Alegre, Rio Grande do Sul;

2) cobaios de qualquer sexo, pesando entre 200 e 350 g, cedidos pelo biotério do LANARA, de Pedro Leopoldo, Minas Gerais;

3) novilhas mestiças Holandes-Zebu pesando entre 200 e 300 kg, mantidas em propriedade rural no Município de Matozinhos, Minas Gerais.

3.4. Amostras utilizadas

Para a produção das toxinas empregadas nos testes de eficiência, foram utilizadas amostras de *Clostridium botulinum**, tipos C e D.

3.5. Meios de cultura

Para a produção de toxina, foram empregados os seguintes meios de cultura:

* Amostras cedidas pelo Professor Hans Rieman, da Univ. Califórnia, USA.

- 1) meio de enriquecimento descrito por SYUTO & KABO (1972);
- 2) meio descrito por WRIGHT et alii (1933);
- 3) meio descrito por CARDELLA et alii (1958).

3.6. Produção de toxinas botulínicas tipos C e D

Para a produção de toxina, as amostras foram semeadas, primeiramente, em meio de enriquecimento (SYUTO & KABO, 1972) e incubadas em estufa, a 37°C, por 24 horas.

Posteriormente, cada amostra foi repicada em meios de WRIGHT (1933) e de CARDELLA et alii (1958). As amostras inoculadas no primeiro meio foram incubadas a 37°C, por um período de nove dias, enquanto as amostras inoculadas no segundo meio foram incubadas em jarras de anaerobiose, tipo GASPAK*, e mantidas a 35°C, por seis dias, ao fim dos quais ocorria a toxigênese máxima (BOWMER, 1963).

Decorrido o tempo de incubação, foram feitas, de cada amostra, lâminas coradas pelo método de Gram, e as frações líquidas colhidas, centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (rpm) a 0°C (OLIVEIRA, 1972). A seguir, os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtros MILLIPORE**, cujas membranas eram dispostas de maneira que a porosidade decrescia, progressivamente, de 1,5 µ até 0,45 µ de diâmetro efetivo (HIGASHI et alii, 1978).

Os filtrados tipos C e D, obtidos em ambos os meios de cultura, foram acondicionados, em pequenas alíquotas, em frascos estéreis, devidamente identificados e mantidos, respectivamente, a 0°C e a -70°C, ao abrigo da luz.

* B.B.L. Microbiology Systems, Becton Dickison and Company. P.O. Box 243 - Cockeysville, MD21030-USA.

** Millipore Intertech-Inc., P.O. Box 255, Bedford, Massachussets - USA.



3.7. Conservação das amostras

As amostras empregadas na produção de toxina foram mantidas a 0°C, em tubos de 20x200 mm contendo meio de WRIGHT (1933), e repicadas a cada 120 dias, pois, segundo STEVENSON et alii (1947), perdem seu poder toxigênico.

3.8. Titulação das toxinas

Para titulação, foram tomadas alíquotas de cada toxina, produzidas em meio de WRIGHT (1933) e de CARDELLA et alii (1958). As toxinas foram diluídas em tampão fosfato gelatina, em diluições decimais. Para cada diluição, inocularam-se cinco camundongos do mesmo sexo, pesando entre 18 e 20 g, com 0,5 ml, por via intraperitoneal. A observação de sintomas e morte dos animais era feita, a partir da inoculação, até 96 horas, de acordo com BOWMER (1963). A seguir, foram calculados os títulos das toxinas em dose letal a 50% (DL₅₀)*, empregando-se a técnica descrita por REED & MUENCH (1938).

Para realização dos testes de eficiência, optou-se pelo uso das toxinas que apresentaram maior título.

Durante todo o experimento, os títulos dos filtrados, mantidos a 0°C e a -70°C, foram avaliados a cada 30 dias.

3.9. Toxinotipia

Para se confirmarem os tipos das toxinas empregadas, utilizou-se a técnica descrita por PREVOT (1955), com as modificações que são especificadas a seguir.

Segundo BOWMER (1963), podem ocorrer reações cruzadas entre os tipos C e D, quando uma Unidade Internacional (U.I.) de antitoxina C neutraliza 10 DL₅₀ de toxina D. Considerando

* DL₅₀ - É a menor concentração de toxina capaz de matar 50% do lote dos camundongos inoculados, em um período de quatro dias.

essa possibilidade, as toxinas foram diluídas em tampão fosfato gelatina, para conterem 500 DL₅₀ por mililitro e por tipo.

A seguir, 1 ml de cada toxina contendo a dose prova foi colocado em tubos de ensaio. A cada tubo, acrescentou-se 1 ml de antitoxina padrão* homóloga, contendo 1 U.I., e o volume foi completado para 2,5 ml com tampão fosfato gelatina. Após homogeneização, os tubos com as misturas foram mantidos em banho-maria, a 37°C, por 60 minutos.

Grupos de quatro camundongos do mesmo sexo, pesando de 18 a 20 g, foram inoculados com 0,5 ml de cada mistura, por via intraperitoneal. Como controle, inocularam-se quatro camundongos para cada tipo de toxina, pela mesma via, com 0,5 ml de toxina com a dose de prova.

Os camundongos foram observados por 96 horas. O tipo foi determinado pela sobrevivência daqueles que receberam a mistura de toxina com antitoxina homóloga.

3.10. Determinação da dose-teste

Para determinação da dose de cada toxina a ser empregada na titulação do soro dos animais imunizados, optou-se pelo nível de teste na dose de L+/10**.

Inicialmente, cada toxina foi diluída com tampão fosfato gelatina, para conter 1000 e 100 DL₅₀/0,1 ml, para os tipos C e D, respectivamente.

A dose-teste foi determinada segundo técnica descrita pelo CENTER FOR DISEASE CONTROL (1980), que pode ser resumida nos seguintes passos:

* U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service, Center for Disease Control, Bureau of Laboratories Atlanta, Georgia, 30333-U.S.A.

** L+/10 - É a quantidade de toxina que, misturada com 0,1 U.I. de antitoxina homóloga, matará 50% dos camundongos, em até 96 horas após a inoculação.

1) Variadas quantidades de cada toxina foram misturadas a 0,5 U.I. de antitoxina homóloga (dose contida em 0,5 ml) e o volume completado para 2,5 ml com tampão fosfato gelatina. Após homogeneização, as misturas foram incubadas em banho-maria a 37°C, por 60 minutos.

2) A seguir, inocularam-se grupos de quatro camundongos, do mesmo sexo, pesando entre 18 e 20 g, com a dose de 0,5 ml, de cada mistura, por via intraperitoneal.

3) Os animais foram observados por quatro dias, e a dose-teste calculada segundo REED & MUENCH (1938).

4) O teste foi repetido após uma semana. Tomou-se, como dose de cada toxina, o mesmo resultado obtido em dois testes consecutivos.

3.11. Provas de controle

3.11.1. Testes de esterilidade

Os testes de esterilidade foram realizados para todas as vacinas e partidas testadas e constituíram-se em semear 1 ml de cada amostra nos seguintes meios de cultura: Caldo Lactosado*, Caldo Casoy*, Tioglicolato** e Caldo Sabouraud**

Com exceção do Caldo Sabouraud, incubado a 25°C, todos os outros meios foram mantidos a 37°C, por períodos de sete a 14 dias, e observados quanto ao crescimento de bactérias e fungos, conforme orientação do BRITISH VETERINARY CODEX (1970).

3.11.2. Testes de inocuidade

Os testes de inocuidade foram feitos através da i-

* Difco Laboratories, Detroit, Michigan-U.S.A.

** Merck, Frankfurter Strasse 250 - D-6100 - Darmstadt-R.F.A.

noculação de 1 ml de cada vacina em camundongos de 18 a 20 g e de 5 ml em cobaios de 250 a 350 g, ambos pela via subcutânea. Os camundongos foram observados por 10 dias e os cobaios, por 21 dias. As vacinas eram consideradas inócuas quando não se evidenciavam alteração local e sinais da doença ou morte nos animais (CARDELLA et alii, 1958).

3.11.3. Níveis de adjuvantes

Os níveis de fosfato de alumínio ($Al PO_4$) e de hidróxido de alumínio [$Al (OH)_3$], empregados como adjuvantes nas vacinas testadas, foram determinados através de testes químicos, de acordo com U.S. PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY (1985).

3.11.4. Testes de potência em camundongos

A potência das vacinas foi determinada através da inoculação de camundongos e de posterior desafio com toxinas C e D, tendo sido a imunogenicidade de cada uma avaliada pelo grau de resistência apresentado. Na realização dos testes, os animais foram inoculados com vacina integral e com vacina em diluições duplicadas.

3.11.4.1. Inoculação com vacina integral em dose única e desafio aos 21 e 35 dias após a vacinação.

Para cada vacina, foram inoculados dois grupos de 60 camundongos do mesmo sexo, pesando entre 18 e 20 g, com 1 ml, pela via subcutânea.

Após 21 dias, o primeiro grupo foi subdividido em dois subgrupos com o mesmo número de animais e novamente subdividido em sete grupos de quatro camundongos desafiados com 0,5 ml, por via intraperitoneal, com doses crescentes em DL de toxinas C e D descritas no item 3.8. segundo a técnica desenvolvida por HOTTLE et alii (1947).

Aos 35 dias, repetiu-se o mesmo experimento com o segundo grupo, aplicando-se a técnica de CARDELLA et alii (1960).

Como controle, inocularam-se, por via intraperitoneal, dois camundongos não-vacinados com a dose de prova de cada toxina.

Em ambos os experimentos, os animais foram observados por 96 horas e a dose de cada toxina que matou 50% dos animais inoculados calculada pelo método REED & MUENCH (1938).

3.11.4.2. Imunização com vacina integral em duas doses

Para cada vacina foram vacinados 60 camundongos do mesmo sexo, pesando de 18 a 20 g, com uma dose de 0,5 ml, por via subcutânea, seguida de reforço, com a mesma dose, três dias após a vacinação inicial.

Após 21 dias, os animais foram divididos em dois grupos iguais e subgrupos de quatro camundongos desafiados com 0,5 ml, por via intraperitoneal, com doses crescentes em DL_{50} de toxinas C e D, conforme descrito no item 3.8.

Como controle, inocularam-se, por via intraperitoneal, dois camundongos não-vacinados com a dose de prova.

Os animais foram observados por 96 horas e a antigenicidade da vacina calculada pelo método de REED & MUENCH (1938), de acordo com a técnica descrita por APPLETON & WHITE (1957).

3.11.4.3. Imunização com vacina diluída

Na avaliação de cada vacina, foram imunizados 180 camundongos do mesmo sexo, pesando de 14 a 17 g, com uma dose de 0,2 ml de diluições duplicadas de vacina (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), por via subcutânea, mantendo-se a mesma concentração do adjuvante empregado na vacina original.

Após 21 dias, os animais foram divididos em dois grupos iguais e 20 camundongos imunizados com cada uma das dilui-

ções da vacina foram desafiados com a dose de 25 DL₅₀ de toxina C e D contida em 0,5 ml, por via intraperitoneal.

Como controle, dois camundongos foram inoculados, pela mesma via, com a dose de prova de cada toxina.

Os animais foram observados por 96 horas e a antigenicidade avaliada pela percentagem de sobrevivência dos animais imunizados com as diferentes diluições, de acordo com a técnica descrita pelo OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOTIES (1986).

3.11.5. Teste de potência em cobaios

A potência das vacinas foi determinada também através da imunização de cobaios e, neste caso, o nível de antitoxina no soro dos animais inoculados foi usado como índice de antigenicidade do toxóide.

Empregou-se, nessa avaliação, a técnica descrita pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970), bem como as modificações da técnica propostas por outros autores, as quais serão detalhadas a seguir.

Para cada vacina, foram inoculados, por via subcutânea, dois grupos de 10 cobaios do mesmo sexo, pesando de 250 a 350 g, com a menor dose indicada pelo laboratório fabricante, ou seja, 1 ml para as vacinas A, B e C e 2 ml para a vacina D.

Após a vacinação, os animais do primeiro grupo foram sangrados na quarta e na sexta semanas, de acordo, respectivamente, com a técnica acima definida e com a modificação proposta por PRANTER (1975).

O segundo grupo recebeu nova dose de vacina aos 21 dias após o estímulo primário e foi sangrado 10 dias após o reforço, segundo técnica descrita por MATHEWS (1976).

A partir de cada colheita, preparou-se um *pool* de soros, que foram titulados em camundongos com a dose-teste de cada toxina, empregando-se a técnica descrita pelo CENTER FOR DISEASE CONTROL (1980).

A vacina era considerada de boa qualidade quando o

pool de soros dos animais imunizados apresentava níveis mínimos de antitoxina de 5 U.I. por mililitro, para o tipo C, de 1 U.I., para o tipo D.

3.11.6. Teste de potência em bovinos

Foram vacinadas cinco novilhas, pesando de 200 a 300 kg, com a dose de 2 ml recomendada pelos laboratórios produtores das vacinas X, Y e Z e de 3 ml da vacina W, por via subcutânea. Após 45 dias, os animais foram revacinados. Como controle, empregaram-se quatro novilhas, do mesmo peso, não-vacinadas.

Após a primeira vacinação, todos os animais foram sangrados por um período de 12 meses, segundo o esquema abaixo:

Dias	Colheita
0 (vacinação).....	1ª
15	2ª
30	3ª
45 (revacinação).....	4ª

A partir da revacinação, as colheitas foram feitas a cada 30 dias.

Após cada sangria, o soro obtido era centrifugado e constituiu-se um *pool* de soros por vacina, que foram acondicionados em frascos estéreis e mantidos a -20°C até o momento da execução dos testes. Cada *pool* de soros foi testado em um período máximo de 30 dias após cada colheita.

Inicialmente, foi feita uma triagem em cada *pool* de soros, através da soroproteção em camundongos, segundo a técnica empregada por TAMMEMAGI & GRANT (1967), conforme detalhamento que se segue.

Para cada tipo de toxina, dois camundongos do mesmo sexo, pesando de 18 a 22 g, foram inoculados, por via intrape-

ritoneal, com 0,5 ml de uma mistura contendo 0,25 ml de cada *pool* de soro e com 0,25 ml de toxina contendo 5 DL₅₀. Antes da inoculação, a mistura era homogeneizada e mantida a 37°C, por 60 minutos.

Como controle, na execução de cada teste, quatro camundongos eram inoculados, por via intraperitoneal, com a dose de prova de cada toxina contida em 0,5 ml.

Os animais foram observados por 96 horas e a sobrevivência dos animais era tomada como indicativo da presença de antitoxina homóloga ã empregada no teste.

Posteriormente, os *pool* de soros que conferiram proteção foram titulados em camundongos, através da inoculação de misturas contendo a dose-teste de cada toxina, com volumes crescentes de cada *pool*, de acordo com a técnica descrita pelo CENTER FOR DISEASE CONTROL (1980).

Foram considerados como títulos protetores níveis mínimos de 0,5 U.I. de cada antitoxina por mililitro de soro, de acordo com STERNE & WENTZEL (1950).



4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Produção e titulação de toxina

A produção de toxinas botulínicas C e D, a partir dos meios de cultura empregados, e os títulos obtidos são apresentados nas TAB. I e II.

Os inóculos de *Clostridium botulinum* tipo C, quando semeados no meio descrito por CARDELLA et alii (1958), apresentaram maior produção de toxina, com títulos médios de $6,31 \times 10^4$ DL₅₀/ml, enquanto, no meio descrito por WRIGHT (1933), os títulos de toxina foram de $3,98 \times 10^3$ DL₅₀/ml. A amostra de *Clostridium botulinum* tipo D apresentou produção de toxina similar em ambos os meios empregados, com títulos médios de $6,3 \times 10^5$ DL₅₀/ml.

Os resultados da produção de toxina da amostra de *Clostridium botulinum* tipo C confirmaram a eficiência do meio de cultura empregado por CARDELLA et alii (1958) em relação aos meios convencionais, a base de proteína animal como fonte nutriente. Esse meio passou, então, a ser utilizado para produção das toxinas empregadas neste trabalho.

Os títulos tóxicos obtidos com as amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D foram inferiores àqueles conseguidos por outros pesquisadores (POLSON & STERNE, 1946; STERNE & WENTZEL, 1950; CARDELLA et alii, 1958; CARDELLA et alii, 1960). Isso, pro

vavelmente, pode ser atribuído não só à toxigenicidade da amostra usada, como também ao processo de produção e ao meio de cultura empregados. Segundo OLIVEIRA (1972), existe uma variação da toxigenicidade de uma amostra para outra, assim como uma relação direta entre o meio de cultura e a produção de toxina.

Entretanto, os títulos obtidos foram suficientes para a execução dos testes realizados e até mesmo superiores aos títulos das toxinas empregadas por TAMMEMAGY & GRANT (1967) na avaliação de imunógenos antibotulínicos.

Durante a pesquisa, foi testada a estabilidade das toxinas botulínicas C e D, que foram mantidas, não-diluídas, à temperatura de -70°C e a 0°C , por 12 meses. Essas toxinas foram tituladas mensalmente em camundongos, e os títulos obtidos, conforme descrição feita no item 4.1., foram mantidos em todas as etapas, não ocorrendo variações entre as alíquotas conservadas a -70°C e a 0°C .

Segundo BOWMER (1963), as toxinas botulínicas C e D são instáveis, devendo ser produzidas todas as vezes que forem utilizadas em testes. TAMMEMAGY & GRANT (1967) observaram, porém, que essas toxinas se mantiveram estáveis por um período superior a 36 meses quando conservadas a 2°C , não-diluídas. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes, não se evidenciando, portanto, a necessidade de se produzirem e titularem as toxinas C e D todas as vezes em que forem empregadas.

4.2. Toxinotipia

Os tipos C e D foram confirmados, pois não ocorreu morte entre os camundongos inoculados com a mistura de toxina com soro homólogo, segundo resultados apresentados na TAB. III.

4.3. Determinação da dose teste

A dose de cada toxina ao nível $L_+/10$, calculado segundo REED & MUENCH (1938), foram de 0,09 e 0,06 ml para os ti

pos C e D, respectivamente, como se pode verificar nas TAB. IV e V.

De acordo com BOWMER (1963), os níveis de teste recomendados para as toxinas C e D seriam L+*. No entanto, optou-se pelo nível L+/10, em decorrência de testes preliminares com os imunógenos, que levaram a uma expectativa de baixos níveis de anticorpos nos animais imunizados. Segundo o CENTER FOR DISEASE CONTROL (1980), o nível de teste a ser empregado depende da potência da toxina e da antitoxina nele utilizadas. Neste experimento, trabalhou-se com as toxinas diluídas e, em consequência do título trabalhado, empregou-se o nível de L+/10.

Esse mesmo nível foi também utilizado por OLIVEIRA (1972) na determinação da dose-teste de toxina A, empregada na titulação de soro antibotulínico produzido em eqüinos.

4.4. Provas de controle

4.4.1. Esterilidade

Todas as vacinas testadas mostraram-se estéreis quando semeadas de acordo com o que se descreve no item 3.11.1, não ocorrendo crescimento de bactérias e/ou fungos.

4.4.2. Inocuidade

Com exceção da vacina Y-2, as outras mostraram-se inócuas nos testes realizados em camundongos e cobaios, conforme descrito no item 3.11.2.

Quando inoculados pela vacina Y-2, os cobaios apresentaram, após sete dias, sinais clínicos de botulismo, caracterizados, principalmente, pelas seguintes manifestações: res-

* L+ - É a quantidade de toxina que, misturada com uma U.I. de antitoxina homóloga, matará 50% do lote de camundongos inoculados, quatro dias após a inoculação.

piração ofegante, incoordenação motora, abdômen cintado, paralisia flácida progressiva, incapacidade de locomoção e, finalmente, asfixia e morte. No entanto, quando inoculada em camundongos, a mesma vacina mostrou-se inócua. A maior resistência dos camundongos em relação ao processo de inativação com formaldeído foi também observada por NIGG et alii (1947) no preparo de toxóides botulínicos tipos A e B. WRIGHT et alii (1960) atribuíram essa resistência à inativação parcial da toxina, de que restaria uma pequena porção que seria mais tóxica para os cobaios. De acordo com esses achados, o processo de inativação deveria ser feito por um período mais longo.

Segundo OLIVEIRA (1972), a destoxificação deve ser realizada primeiramente em camundongos. Caso esses animais não apresentem sintomas de botulismo até o décimo dia após a inoculação, são inoculados cobaios, que devem ser observados por 40 dias. A prova prévia em camundongos é indicativa da presença de toxicidade residual.

O resultado apresentado neste trabalho demonstra que o teste de inocuidade da vacina Y-2, não foi conduzido segundo critérios estabelecidos para a produção de toxóides botulínicos e que a presença da toxicidade residual pode implicar riscos de acidente vacinal.

4.4.3. Concentração de adjuvantes

Os níveis de fosfato de alumínio ($AlPO_4$) e de hidróxido de alumínio [$Al(OH)_3$] estão apresentados na TAB. VI. Os resultados obtidos demonstram uma significativa variação nos níveis de adjuvantes entre as diferentes partidas e vacinas avaliadas.

Os níveis de fosfato de alumínio nas vacinas X-1 (14,85 mg/ml) e Y-1 (14,23 mg/ml) foram similares aos empregados por STERNE & WENTZEL (1950), enquanto a vacina Y-2 (6,82 mg/ml) apresentou concentração inferior às outras. Esses autores estabeleceram a importância de se manterem níveis adequados des-

te adjuvante para a obtenção de vacinas mais potentes. Segundo eles, vacinas fluidas ou com baixas concentrações de adjuvante apresentam a sua potência reduzida em cerca de 30 vezes.

Ao se compararem os níveis de óxido de alumínio (Al_2O_3) com a concentração recomendada pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970), que é de 2 a 3 mg/ml, observou-se que as vacinas X-1 (5,95 mg/ml) e Y-1 (6,21 mg/ml) apresentam níveis superiores aos recomendados, enquanto a vacina Y-2 (2,85 mg/ml) atende às recomendações do referido código. Tais concentrações acarretam uma maior diluição dos antígenos; portanto, os laboratórios que empregam o fosfato de alumínio deveriam padronizar o nível do adjuvante, através da concentração final de óxido de alumínio (Al_2O_3), segundo o BRITISH VETERINARY CODEX (1970).

Diferentes níveis na concentração de hidróxido de alumínio [$Al(OH)_3$] também foram observados nas vacinas Z e W, que utilizam esse produto como adjuvante. Segundo HEPPLÉ (1967), os melhores resultados na imunização de animais contra as clostridioses foram obtidos na concentração final de 6 mg/ml. Entretanto, esse mesmo autor observou variações nos resultados obtidos com diferentes tipos de gel de hidróxido de alumínio empregados no trabalho. Essas variações foram atribuídas à não-padronização dos produtos. Os resultados encontrados nas vacinas Z-2 (1,19 mg/ml), Z-3 (3,96 mg/ml) e W-1 (4,31 mg/ml) foram inferiores ao nível recomendado pelo autor. No entanto, quando se comparam os níveis de óxido de alumínio (Al_2O_3) das referidas vacinas, com exceção da Z-2 (0,78 mg/ml), verifica-se que estão dentro dos limites estabelecidos pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970).

Pelos dados apresentados, observa-se falta de padronização das vacinas testadas, já que ocorrem variações entre os níveis dos adjuvantes até mesmo entre as partidas de um mesmo laboratório. Fazem-se, pois necessários a utilização de um mesmo tipo de adjuvante pelos laboratórios produtores e o emprego de único parâmetro na determinação dos níveis para cada vacina, podendo-se utilizar, para tanto, a determinação do

nível de óxido de alumínio como teste-padrão.



4.5. Testes de proteção

4.5.1. Testes de potência das vacinas em camundongos

4.5.1.1. Camundongos inoculados com vacina não diluída

Os resultados dos testes de potência em camundongos inoculados com vacina não diluída são apresentados nas TAB. VII e VIII.

Das vacinas testadas, apenas as partidas Z-1 e W-1 conferiram alguma proteção aos camundongos imunizados contra o desafio aos 21 e aos 35 dias após a vacinação com doses crescentes de toxinas D e C, respectivamente. A vacina Z-1 conferiu proteção contra a dose de 500 DL₅₀ para a toxina D; entretanto não conferiu proteção contra o desafio com toxina C (TAB. VII). Com relação à vacina W-1, o nível de proteção obtido foi de 63 DL₅₀ para o tipo C, enquanto nenhuma proteção foi conferida contra o desafio com toxina D (TAB. VIII).

Em todos os testes, os animais não-imunizados empregados como controle morreram 24 horas após o desafio com as doses de prova de cada toxina.

Os níveis de proteção conferidos aos animais imunizados com as vacinas testadas foram muito inferiores quando comparados a experimentos correlatos.

HOTTLE et alii (1947) obtiveram proteção dos camundongos imunizados com toxóides botulínicos monovalentes A e B contra o desafio com doses de 4×10^4 DL₅₀. CARDELLA et alii (1958, 1960), ao imunizarem camundongos com toxóides botulínicos monovalentes C e D, conseguiram que esses resistissem ao desafio de $1,1 \times 10^6$ DL₅₀, para o tipo C, e de 1×10^6 DL₅₀, para a toxina tipo D. Outros pesquisadores também obtiveram níveis de proteção equivalentes, ao avaliarem imunógenos antibotulínicos em camundongos (APPLETON & WHITE, 1957; WRIGHT et alii, 1960).

Neste experimento, procurou-se comparar a resposta antigênica de camundongos imunizados com uma única dose e desafiados aos 21 e aos 35 dias após a vacinação com a de animais imunizados com duas doses seguidas de desafio aos 21 dias.

Segundo CARDELLA et alii (1958, 1960), os camundongos apresentam melhor resposta antigênica quando desafiados aos 35 dias após a vacinação. Contudo, os resultados apresentados (TAB. VII e VIII) foram os mesmos quando o desafio foi feito aos 21 e aos 35 dias após a vacinação. Esses resultados demonstram que o desafio de camundongos imunizados com toxóides botulínicos pode ser feito aos 21 dias após a vacinação, período também empregado por outros pesquisadores (HOTTLE et alii, 1947; APPLETON & WHITE, 1967; WRIGHT et alii, 1960).

A utilização de dose reforço não contribuiu para uma melhor resposta nos animais, pois os níveis de proteção foram os mesmos apresentados por aqueles que receberam uma única dose. Esses achados concordam com o experimento realizado por APPLETON & WHITE (1957). Portanto, na avaliação de imunógenos antibotulínicos em camundongos, pode-se empregar uma única dose de vacina.

Pelos resultados apresentados, pôde-se constatar o baixo nível antigênico dos imunógenos avaliados. Mesmo quando conferiram alguma imunidade, eles sô protegeram contra um tipo de toxina. No entanto, para se implantar essa técnica na avaliação de vacinas antibotulínicas, são necessários novos ensaios, com o intuito de se estabelecerem níveis mínimos de proteção para cada tipo de toxina.

4.5.1.2. Camundongos imunizados com vacina diluída

Os resultados do teste de potência em camundongos inoculados com dose única de vacina em diluições duplicadas são apresentados nas TAB. IX e X.

Nenhuma das vacinas empregadas no teste atendeu aos requisitos mínimos exigidos pela técnica, que eram de 80% de

sobrevivência dos animais vacinados com as diluições 1:2 e 1:4 e de 50% com a diluição 1:8. As partidas Z-1 e W-1, que apresentaram algum nível de proteção (TAB. VII e VIII) quando testadas em camundongos vacinados com vacina integral, não foram avaliadas com essa técnica, pelo fato de não se ter obtido quantidade suficiente dos referidos produtos no momento da execução do teste.

Os resultados apresentados no teste (TAB. IX e X) foram, porém, muito inferiores aos níveis exigidos. Nenhum dos produtos testados conferiu índices de proteção satisfatórios, alcançando o máximo de 30% de sobrevivência nos animais imunizados com a vacina Z-2 e W-2 na diluição 1:2, em face do desafio com a dose de prova das toxinas C e D, respectivamente. Os imunógenos empregados na diluição 1:8 e 1:16 não conferiram nenhuma proteção aos camundongos contra o desafio.

Esses resultados demonstram a baixa antigenicidade das vacinas testadas, confirmando os resultados obtidos em camundongos imunizados com vacina integral. Quanto à técnica empregada, é a mesma utilizada oficialmente na avaliação de vacinas antituberculínicas empregadas nos países escandinavos e também adotada pelo OFFICE INTERNATIONAL DE EPIZZOTIES (1986). De acordo com essa entidade, os índices de eficiência dos produtos a serem testados devem ser determinados através de uma vacina bivalente de eficiência conhecida. Entretanto, a técnica original determina níveis mínimos de sobrevivência dos animais imunizados com diferentes diluições da vacina, não se necessitando, portanto, da realização de testes pareados com vacina-padrão, que deve ser empregada apenas na aferição da técnica.

A eficiência dessa técnica foi confirmada por PRANTER (1975), que obteve taxas de sobrevivência superiores às requeridas pelo teste na avaliação de toxóide botulínico tipo C. Segundo esse autor, as técnicas que empregam a resistência ao desafio como medida da antigenicidade são mais seguras que os modelos que avaliam a resposta a toxóides através da determinação do título de antitoxina humoral. Para a utilização dessa

técnica, seria necessário, porém, aferi-la em face de uma vacina de eficiência conhecida.

4.5.2. Teste de potência das vacinas em cobaios

Os resultados do teste de potência em cobaios, através da soroneutralização em camundongos, são apresentados na TAB. XI.

Das partidas de vacina testadas, nenhuma atingiu os níveis de antitoxina recomendados pelo BRITISH VETERINARY CODEX (1970), que seriam de 5 e de 1 U.I./ml, respectivamente, para os tipos C e D. Essa técnica é empregada oficialmente na avaliação de imunógenos antibotulínicos no Reino-Unido e também adotada na Austrália. No entanto, alguns autores questionam os resultados obtidos com a prova.

Segundo PRANTER (1975), o emprego de uma única dose de vacina não seria satisfatório para induzir a uma boa resposta imune e a utilização de uma dose de reforço, como é preconizada para os testes de proteção contra outras clostridioses, levaria a uma melhor resposta. Em seu experimento, esse autor demonstrou tal teoria. Os animais, quando imunizados com uma única dose, não atingiam o nível de antitoxina recomendado, mas, quando revacinados, apresentavam um nível de antitoxina superior ao preconizado pela técnica.

Já MATHEWS (1976) sugere que os animais sejam vacinados com uma única dose e sangrados a partir da sexta semana após a vacinação, pois este seria o momento em que se detectaria maior quantidade de antitoxina humoral. Esse achado foi constatado experimentalmente pelo autor.

No presente experimento, procurou-se seguir as modificações propostas por diferentes autores e observaram-se alterações nos níveis de antitoxina não só no soro dos animais sangrados na quarta e na sexta semanas, mas também no de animais que receberam reforço. Entretanto, os níveis de antitoxina, exceção feita ao tipo C da vacina W-2, não foram ainda su

ficientes para atender aos requisitos mínimos exigidos pelo teste.

4.5.3. Teste de potência das vacinas em bovinos

Devido ao grande número de amostras de soro bovino a serem tituladas, foi feito um *pool* para cada vacina testada, técnica esta utilizada para a titulação de antitoxina em cobaias vacinados, segundo o BRITISH VETERINARY CODEX (1970).

4.5.3.1. Teste de soroproteção

Os resultados do teste de soroproteção empregado na triagem dos *pool* de soros dos animais imunizados são apresentados nas TAB. XII e XIII.

De acordo com os resultados, apenas o soro dos animais imunizados com as vacinas Y-1 e Z-1 conferiram proteção aos camundongos inoculados com a mistura de soro com a dose de prova de cada toxina. O soro dos animais vacinados com a vacina Y-1 só protegeram os camundongos contra o tipo C a partir da oitava semana até a 16ª semana após a vacinação (TAB. XII). Os bovinos imunizados com a vacina Z-1 só conferiram soroproteção em face da toxina D a partir da oitava semana até a 52ª semana após a vacinação (TAB. XIII).

Esses achados demonstram a baixa antigenicidade dos imunógenos avaliados quando comparados aos testes realizados por outros pesquisadores.

MANSON et alii (1938), ao realizarem testes de soroproteção em camundongos, observaram que 0,1 ml de soro de bovinos imunizados neutralizava doses superiores a 5 DML de ambas as toxinas, enquanto TAMMEMAGY & GRANT (1967) constataram também que o soro dos animais imunizados protegia camundongos a partir da terceira semana após a vacinação até 12 meses.

Pelos resultados encontrados (TAB. XII e XIII), mesmo aquelas vacinas que conferiram alguma imunidade só protege-

ram contra um dos antígenos que compõem a vacina e essa proteção foi mais tardia, ocorrendo somente após a dose de reforço.

4.5.3.2. Titulação do soro dos bovinos imunizados

Apenas os *pool* de soros dos animais que demonstraram algum nível de antitoxina no teste de soroneutralização foram titulados e os resultados apresentados nas TAB. XIV e XV.

Os animais imunizados com as vacinas Y-1 e Z-1 apresentaram níveis de antitoxinas detectáveis a partir do 15º dia após o reforço ou na oitava semana após a dose inicial. No soro dos animais vacinados com a vacina Y-1, encontraram-se níveis inferiores a 0,1 U.I./ml de antitoxina C, que foram mantidos até a 16ª semana e, a partir daí, não foram mais detectados. Nesse mesmo soro, não foi encontrada nenhuma resposta à toxina D. Já nos soros dos animais imunizados com a vacina Z-1, são encontrados níveis de antitoxina D. Esses níveis foram detectados a partir da oitava semana ou no 15º dia após o reforço e permaneceram até a 52ª semana. Entretanto, ocorreu um rápido declínio, como pode ser visto na TAB. XV, para níveis inferiores a 0,1 U.I./ml de soro.

Os níveis de antitoxina C e D dos bovinos imunizados com as vacinas Y-1 e Z-1 foram inferiores aos obtidos por outros pesquisadores na avaliação de imunógenos antibotulínicos.

STERNE & WENTZEL (1950), ao testarem soros de bovinos imunizados, detectaram níveis de 0,5 U.I./ml de antitoxinas C e D seis semanas após o estímulo primário. Doze dias após o reforço, esses níveis foram superiores a 200 U.I./ml.

JANSEN et alii (1976), ao avaliarem soros de bovinos imunizados com toxóide bivalente C e D, encontraram níveis superiores a 0,5 U.I./ml a partir da segunda semana após a dose de reforço.

MATHEWS (1976), ao determinar os níveis de antitoxina C no soro de bovinos imunizados com toxóide monovalente, ob

servou que os animais imunizados com duas doses de 5 ml, com um intervalo de seis semanas, apresentaram títulos de 10 U.I./ml a partir da segunda semana após o reforço. Esse nível variou nos meses subsequentes, sendo ainda detectados 0,8 U.I./ml na 24ª semana após a dose inicial. Os animais imunizados com uma única dose de 2,5 ou de 5 ml apresentaram títulos inferiores a 0,3 U.I./ml de soro.

A melhor resposta humoral dos animais duas semanas após o reforço com as vacinas Y-1 e Z-1 (TAB. XIV e XV) confirma os achados de JANSEN et alii (1976) e MATHEWS (1976). No entanto, os níveis de antitoxinas obtidos foram inferiores, decaindo rapidamente a partir da 10ª semana.

Segundo JANSEN et alii (1976), não há informação de finida quanto à quantidade de toxina botulínica ingerida pelo bovino no campo. A julgar pelo grau de toxicidade atingida pelos fragmentos de carcaças e pela quantidade de massa ingerida pelos bovinos, que pode ser substancial nessas condições, o nível de imunidade requerida pelo animal exposto ao material tóxico não pode ser conhecida e, na prática, é necessário que os animais apresentem um nível de imunidade tão alto quanto possível.

Pelo exposto, pode-se avaliar a necessidade de se empregarem imunógenos que favoreçam a produção de altos níveis de anticorpos humorais. De acordo com STERNE & WENTZEL (1950), níveis de 0,5 U.I./ml de soro são necessários para conferir proteção aos bovinos imunizados. As vacinas testadas, segundo os resultados apresentados, demonstraram ser pouco antigênicas e alguns produtos não induziram a nenhuma resposta nos animais imunizados. Aquelas que levaram a alguma imunidade foram, contudo, inaptas, pois os animais apresentaram uma resposta incipiente a apenas um dos antígenos.

Em decorrência da baixa antigenicidade apresentada pelos produtos testados, alguns aspectos podem ser discutidos.

Os esquemas de vacinação recomendados pelos laboratórios produtores, segundo os quais os animais devem ser imu-

nizados com uma dose de vacina, seguidas de reforço após seis semanas, são similares aos adotados nos países onde a doença representa risco para os bovinos. Entretanto, existem variações quanto à dose a ser inoculada. Os laboratórios nacionais, recomendam doses de 2 ml (X, Y e Z) e 3 ml (W); na Austrália, segundo MATHEWS (1976), os bovinos são inoculados com doses de 5 ml enquanto na África do Sul de acordo com JANSEN et alii (1976), a dose utilizada é a mesma recomendada pela maioria dos laboratórios nacionais, mas os imunógenos são padronizados por floculação, para que cada dose contenha níveis mínimos de 1 a 2,5 unidades floculantes (LF)*, para o toxóide C, e 10 a 20 Lf, para o toxóide D. Conseqüentemente, o volume a ser inoculado depende dos níveis de toxicidade atingidos pelas culturas de *Clostridium botulinum*, que variam segundo a toxigenicidade da amostra utilizada e a técnica de produção empregada. Esse fato foi observado durante a realização do experimento, quando uma mesma amostra apresentou níveis tóxicos diferenciados, se cultivada em diferentes meios. Pode-se, portanto, inferir que as vacinas testadas não apresentaram níveis adequados dos antígenos na dose empregada; assim sendo, foram produzidas a partir de toxinas com baixos títulos, obtendo, por isso, uma fraca resposta nos animais imunizados.

* LF - É a quantidade de toxina equivalente a 1 U.I. de anti-toxina-padrão estabelecida por floculação.

TABELA I - Determinação da DL₅₀ em camundongos da toxina botulínica tipo C produzida nos meios de CARDELLA et alii (1958) e WRIGHT (1933)

Título em DL ₅₀ /ml	Diluição da toxina	Meio de CARDELLA ¹				Meio de WRIGHT ²			
		Tempo de observação (horas)				Tempo de observação (horas)			
		24	48	72	96	24	48	72	96
2 x 10 ¹	10 ⁻¹	5/5 ³	-	-	-	5/5	-	-	-
2 x 10 ²	10 ⁻²	5/5	-	-	-	5/5	-	-	-
2 x 10 ³	10 ⁻³	3/5	4/5	5/5	-	4/5	4/5	4/5	4/5
2 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	2/5	3/5	5/5	-	1/5	2/5	2/5	2/5
2 x 10 ⁵	10 ⁻⁵	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2 x 10 ⁶	10 ⁻⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

¹ = DL₅₀/ml = 6,31 x 10⁴

² = DL₅₀/ml = 3,98 x 10³

³ = $\frac{\text{Número Animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$

TABELA II - Determinação da DL₅₀ em camundongos da toxina botulínica tipo D produzida nos meios de CARDELLA et alii (1958) e WRIGHT (1933)

Título em DL ₅₀ /ml	Diluição da toxina	Meio de CARDELLA ¹				Meio de WRIGHT ²			
		Tempo de observação (horas)				Tempo de observação (horas)			
		24	48	72	96	24	48	72	96
2 x 10 ¹	10 ⁻¹	5/5 ³	-	-	-	5/5	-	-	-
2 x 10 ²	10 ⁻²	5/5	-	-	-	5/5	-	-	-
2 x 10 ³	10 ⁻³	4/5	5/5	-	-	4/5	5/5	-	-
2 x 10 ⁴	10 ⁻⁴	3/5	5/5	-	-	3/5	5/5	-	-
2 x 10 ⁵	10 ⁻⁵	0/5	5/5	-	-	0/5	5/5	-	-
2 x 10 ⁶	10 ⁻⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

¹ = DL /ml = 6,31 x 10⁵

² = DL /ml = 6,31 x 10⁵

³ = $\frac{\text{Número Animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$

TABELA III - Toxinotipia das amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D usados como padrão

Toxinas 500 DL ₅₀ /ml	Soro padrão homólogo 1 U.I./ml	Solução gelatina fosfatada	Volume inoculado	Animais número	Tempo de observação em horas		
					24	48	72
1 ml ¹	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	1	S	S	S
				2	S	S	S
				3	S	S	S
				4	S	S	S
1 ml ²	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	1	S	S	S
				2	S	S	S
				3	S	S	S
				4	S	S	S
1 ml ¹	-	1,5 ml	0,5 ml	1	+	-	-
				2	+	-	-
1 ml ²	-	1,5 ml	0,5 ml	1	+	-	-
				2	+	-	-

¹ = Toxina C - 500 DL /ml.

² = Toxina D - 500 DL /ml.

S = Sobrevivência.

+ = morte.

TABELA IV - Determinação da dose-teste (L+/10) da toxina botulínica tipo C usada como padrão¹

Toxina diluída ² 1:6,3 (0,1 U.I = 1000 DL ₅₀)	Soro padrão diluído 1:10 (0,1 U.I = 0,1 U.I)	Solução de gelatina fosfatada	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
0,10 ml	0,5 ml	1,9 ml	0/4 ³	0/4	0/4	0/4
0,20 ml	0,5 ml	1,8 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,30 ml	0,5 ml	1,7 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,40 ml	0,5 ml	1,6 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,50 ml	0,5 ml	1,5 ml	0/4	2/4	4/4	0/4
0,60 ml	0,5 ml	1,4 ml	1/4	3/4	4/4	-
0,70 ml	0,5 ml	1,3 ml	3/4	3/4	4/4	-
0,80 ml	0,5 ml	1,2 ml	4/4	-	-	-
0,90 ml	0,5 ml	1,1 ml	4/4	-	-	-

¹ = L+/10 - 0,09 ml.

² = Volume para cinco camundongos.

³ = Número animais mortos
Número animais inoculados



TABELA V - Determinação da dose-testes (L+/10) da toxina botulínica tipo D usada como Padrão¹

Toxina diluída ² 1:206,3 (0,1 ml = 1000 DL)	Soro padrão diluído 1:10 (0,1 ml = 0,1 U.I.)	Solução de gelatina fosfatada	Tempo de observação em horas			
			24	48	72	96
0,10 ml	0,5 ml	1,9 ml	0/4 ³	0/4	0/4	0/4
0,20 ml	0,5 ml	1,8 ml	0/4	0/4	0/4	0/4
0,30 ml	0,5 ml	1,7 ml	0/4	1/4	2/4	2/4
0,40 ml	0,5 ml	1,6 ml	1/4	2/4	4/4	-
0,50 ml	0,5 ml	1,5 ml	2/4	3/4	4/4	-
0,60 ml	0,5 ml	1,4 ml	3/4	4/4	-	-
0,70 ml	0,5 ml	1,3 ml	4/4	-	-	-
0,80 ml	0,5 ml	1,2 ml	4/4	-	-	-
0,90 ml	0,5 ml	1,1 ml	4/4	-	-	-

¹ = L+/10 - 0,06 ml.

² = Volume para cinco camundongos.

³ = $\frac{\text{Número animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$



TABELA VI - Concentração de hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$ e fosfato de alumínio $(AlPO_4)$ usados como adjuvantes nas vacinas antitubercinicas testadas

Vacinas	Fosfato de alumínio ($AlPO_4$)	Hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$	Óxido de alumínio Al_2O_3
Partidas	mg/ml	mg/ml	mg/ml
X-1	14,85	-	5,95
Y-1	14,23	-	6,21
Y-2	6,82	-	2,85
Z-1*	-	-	-
Z-2	-	1,19	0,78
Z-3	-	3,96	2,59
W-1	-	4,31	2,82
W-2	-	5,54	3,62

* Não foi determinada a concentração de adjuvante.

TABELA VII - Teste de potência em camundongos inoculados com a vacina Z-1 através do desafio com doses crescentes de toxinas botulínicas tipos C e D

Dose desafio ¹ em DL ₅₀	Dose única desafio 21 dias		Dose única desafio 35 dias		Dose dupla desafio 21 dias	
	toxinas		toxinas		toxinas	
	C	D	C	D	C	D
10.000	4/4 ²	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5.000	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1.000	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
500	4/4	2/4	4/4	2/4	4/4	2/4
100	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4
50	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4
10	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4

¹ = A dose de toxina que determinou a morte de 50% dos camundongos foi de 500 DL₅₀ (calculado pelo REED & MUENCH, 1938).

² = $\frac{\text{Número animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$

TABELA VIII - Teste de potência em camundongos inoculados com a vacina W-1 através do desafio com doses crescentes de toxinas botulínicas tipos C e D

Dose desafio ¹ em DL ₅₀	Dose única desafio 21 dias		Dose única desafio 35 dias		Dose dupla desafio 21 dias	
	toxinas		toxinas		toxinas	
	C	D	C	D	C	D
10.000	4/4 ²	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5.000	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1.000	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
500	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
100	2/4	4/4	2/4	4/4	2/4	4/4
50	2/4	4/4	2/4	4/4	2/4	4/4
10	1/4	4/4	1/4	4/4	1/4	4/4

¹ = A dose de toxina que determinou a morte de 50% dos camundongos foi de 63 DL₅₀ (cálculo pelo REED & MUENCH, 1938).

² = $\frac{\text{Número animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$

TABELA IX - Teste de potência em camundongos inoculados com dose única de vacina diluída, através do desafio com dose constante de toxina botulínica tipo C

Vacina partida	Dose ¹		Desafio 21 dias/25 DL ₅₀ toxina ²			
	Diluição inoculada	Camundongos por diluição	Sobrevivência	% de sobrevivência	% esperada de sobrevivência	
X-1	1:2	0,2 ml	20	2	10	80
	1:4			1	5	80
	1:8			0	-	50
	1:16			0	-	-
Y-2	1:2	0,2 ml	20	4	20	80
	1:4			1	5	80
	1:8			0	-	50
	1:16			0	-	-
Z-2	1:2	0,2 ml	20	0	-	80
	1:4			0	-	80
	1:8			0	-	80
	1:16			0	-	50
W-2	1:2	0,2 ml	20	6	-	-
	1:4			4	20	80
	1:8			2	10	50
	1:16			0	-	-
			8 ³	0	-	0

¹ = Inoculação por via subcutânea.

² = Dose contida em 0,5 ml por via intraperitoneal.

³ = Grupo controle inoculado por via intraperitoneal com a dose de prova

TABELA X - Teste de potência em camundongos inoculados com dose única de vacina diluída, através do desafio com dose constante de toxina botulínica tipo D

Vacina partida	Diluição	Dose ¹ inoculada	Desafio 21 dias/25 DL ₅₀ de toxina ²		% esperada de sobrevivência
			Camundongos por diluição	Sobrevivência	
X-1	1:2	0,2 ml	20	1	10
	1:4			0	-
	1:8			0	-
	1:16			0	-
Y-2	1:2	0,2 ml	20	2	10
	1:4			0	-
	1:8			0	-
	1:16			0	-
Z-2	1:2	0,2 ml	20	6	30
	1:4			2	10
	1:8			0	-
	1:16			0	-
W-2	1:2	0,2 ml	20	4	20
	1:4			2	10
	1:8			0	-
	1:16			0	-
			8 ³	0	0

¹ = Inoculação por via subcutânea.

² = Dose contida em 0,5 ml por via intraperitoneal.

³ = Grupo controle inoculado por via intraperitoneal com a dose de prova

TABELA XI - Níveis de antitoxinas C e D em "pool" de soros de cobaias na quarta e sexta semana após vacinação com toxóides bivalentes com dose única e reforço

Vacina partida	Resposta em U.I./ml para o tipo C após		Resposta em U.I./ml para o tipo D após	
	4 semanas	6 semanas	4 semanas	6 semanas
	Dose única	Reforço	Dose única	Reforço
X-1	N.D	N.D	N.D	N.D
Y-1	0,1	0,6	N.D	N.D
Y-2	N.D	N.D	N.D	N.D
Z-1	N.D	N.D	0,4	0,6
Z-2	N.D	N.D	<0,2	0,5
W-2	2,5	5	N.D	N.D

N.D = Níveis de antitoxinas não detectáveis com a dose teste usada.



TABELA XII - Soroproteção em camundongos inoculados com a mistura toxina C mas "pool" de soro de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D, colhidos a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação¹

Período após dose inicial Semanas	Vacinas/partidas			
	X-1	Y-1	Z-1	W-1
2	2/2 ²	2/2	2/2	2/2
4	2/2	2/2	2/2	2/2
6 (reforço)	2/2	2/2	2/2	2/2
8	2/2	0/2	2/2	2/2
12	2/2	0/2	2/2	2/2
16	2/2	0/2	2/2	2/2
20	2/2	2/2	2/2	2/2
52	2/2	2/2	2/2	2/2

¹ = Foram inoculados 2 camundongos por via intraperitoneal com 0,5 ml contendo a dose de 5 DL₅₀ mais 0,25 ml de soro.

² = $\frac{\text{Número animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$



TABELA XIII - Soroproteção em camundongos inoculados com a mistura toxina D mais "pool" de soro de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D, colhidos a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação¹

Período após dose inicial	Vacinas/partidas				
	Semanas	X-1	Y-1	Z-1	W-1
2		2/2 ²	2/2	2/2	2/2
4		2/2	2/2	2/2	2/2
6 (reforço)		2/2	2/2	2/2	2/2
8		2/2	2/2	0/2	2/2
12		2/2	2/2	0/2	2/2
16		2/2	2/2	0/2	2/2
20		2/2	2/2	0/2	2/2
†					
†					
†					
52		2/2	2/2	0/2	2/2

¹ = Foram inoculados 2 camundongos por via intraperitoneal com 0,5 ml contendo a dose de 5 DL₅₀ mais 0,25 ml de soro.

² = $\frac{\text{Número animais mortos}}{\text{Número animais inoculados}}$

TABELA XIV - Resposta de antitoxina C e D em "pool" de soros de bovinos imunizados com a vacina Y-1 a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação

<u>Período após dose inicial</u>	<u>Antitoxina tipo C</u>	<u>Antitoxina tipo D</u>
Semanas	U.I./ml	U.I./ml
2	N.D	N.D
4	N.D	N.D
6 (reforço)	N.D	N.D
8	< 0,1	N.D
12	< 0,1	N.D
16	< 0,1	N.D
20	N.D	N.D
52	N.D	N.D

N.D = Nível de antitoxina não detectado com a dose teste usada (L+/10).

TABELA XV - Resposta de antitoxina C e D em "pool" de soro de bovinos imunizados com a vacina Z-1 a partir da 2ª até a 52ª semana após a vacinação

<u>Período após dose inicial</u>	<u>Antitoxina tipo C</u>	<u>Antitoxina tipo D</u>
Semanas	U.I./ml	U.I./ml
2	N.D	N.D
4	N.D	N.D
6 (reforço)	N.D	N.D
8	N.D	0,1
12	N.D	1,0
16	N.D	0,5
20	N.D	< 0,1
1		
1		
1		
52	N.D	< 0,1

N.D = Níveis não detectados com a dose teste usada (L+/10).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e nas condições em que foram realizados os experimentos, são possíveis as seguintes conclusões:

. as vacinas antitoxinicas testadas mostraram-se pouco ou não imunogênicas, verificando-se variações entre partidas de um mesmo laboratório;

. dos testes empregados na avaliação da eficiência das vacinas, os que utilizaram o desafio como forma de avaliação da imunogenicidade mostraram-se mais práticos. Entretanto, novos ensaios com um toxóide botulínico bivalente C e D de eficiência conhecida, tornam-se necessários para se estabelecer uma correlação entre os testes em animais de laboratório e a resposta imune do bovino;

. é preciso rever os mecanismos empregados na produção dos imunógenos em uso no Brasil e estabelecer-se uma técnica padronizada para essa produção.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P.N. & SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. 2. ed., Washington, OPS/OMS, 1986. 989p.
2. APPLETON, G.S. & WHITE, P.G. *Clostridium botulinum* type C. I. studies on laboratory variables affecting toxin production and toxoid evaluation. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 18(69):942-6, 1957.
3. BEEL, J.F.; FARRELL, R.K.; GORHAM, J.R. A polyvalent toxoid for botulism in mink. *Am J. Vet. Rs.*, Schaumburg, 18(66): 167-70, 1957.
4. BENGSTON, I.A. Preliminary note on a Toxin-producing anaerobe isolated principally from the larvae *Lucilia Caesar*. *Public. Health. Report*, Washington, 37(4):164-70, 1922.
5. BENNETS, H.W. & HALL, H.T.B. Botulism of sheep and cattle in western Australia: It's cause and prevention by immunization. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 17:105-18, 1938.
6. BOWMER, E.J. Preparation and assay of the international standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E. *Bull. WHO*, Geneva, 29:701-9, 1963.
7. BRITISH VETERINARY CODEX, 1965. Supplement 1970. London, Pharmaceutical Press, 1970. 317p.

8. CARDELLA, M.A.; DUFF, J.T.; GOTTFRIED, C.; BEGEH, J.S. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. IV. Production and purification of type C toxins for conversion to toxoid. *J. Bacteriol.*, Washington, 75(3):360-5, 1958.
9. CARDELLA, M.A.; DUFF, J.T.; WINGFIELD, B.H.; GOTTFRIED, C. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. VI. Purification and detoxification of type D toxins and the immunological response to toxoid. *J. Bacteriol.*, Washington, 79(3):372-8, 1960.
10. CENTER FOR DISEASE CONTROL-U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. *Clostridium botulinum polivalent and monovalent antitoxin for neutralization*. Atlanta, 1980. 14p. (B305, B43).
11. GILLESPIE, J.H. & TIMONEY, J.F. Hagan and Bruner's infectious disease of domestic animals. 7 ed., New York, Cornell University Press, 1981.
12. HENNING, M.W. *Animal disease in South Africa*. 3. ed., Pretoria, Central News Agency, 1956. 1237p.
13. HEPPLER, J.R. Aluminium hydroxide as an adjuvant for clostridial vaccines. *Symp. Ser. Immunobiol. Stard*, Basel, 6:173-80, 1967.
14. HIGASHI, H.J.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T.; SILVA, M. A. Preparação de soro antitoxinico tipo B pela hepermunização de cavalos, no Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, 42/43:72-85, 1978/79.
15. HOLLAND, 1918 apud HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E. P.T.; SILVA, M.A. op. cit.
16. HOTTLE, G.A.; NIGG, C.; LIGHTY, J.A. Methods for determining antigenicity in animals. *J. Immunol.*, Baltimore, 55 (3):255-62, 1947.
17. JANSEN, B.C.; KNOETZE, P.C.; VISSER, F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, Pretoria, 43(4):165-74, 1976.

18. LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; TOKÁRNIA, C.H. Botulismo epizoótico em bovinos no Brasil. *Agroquímica*, São Paulo, 20:22-6, 1983.
19. LARSEN, A.E.; NICHOLS, P.S.; GEBHARDT, L. P. Successful immunization of mink with a toxoid against *Clostridium botulinum*, type C. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 16(61): 573-5, 1955.
20. MANSON, J.H.; STEYN, H.P.; BISSCHOP, J.H.R. The immunization of bovines against Lamsiekte. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.*, Pretoria, 9(2):65-72, 1938.
21. MATHEWS, A.G. Antitoxin responses to *Clostridium botulinum* vaccines types C and D in guinea pigs. *Dev. Biol. Stand.*, Basel, 32:193-201, 1976.
22. NIGG, C.; HOTTLE, G.A.; CORIELL, L.L.; ROSENWALD, A. S.; BEVERIDGE, G.W. Studies on botulinum toxoid, types A and B: I. production of alum precipitates toxoids. *J. Immunol.*, Baltimore, 55(3):245-53, 1947.
23. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOTIES. Paris. Infecciones Clostridiales. Botulismo. In: _____. *Código Zoosanitário internacional; reglamentación recomendada, para los intercambios de animales y productos animales*. 5. ed., Paris, 1986. p.439-41.
24. OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação do soro anti-botulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, 36:1-40, 1972.
25. POLSON, A. & STERNE, M. Production of potent botulinum toxins and formol-toxoids. *Nature*, London, 158:238-9, 1946.
26. PRANTER, W. Results of potency tests of a vaccine against *Clostridium botulinum* type C by different methods, *Dev. Biol. Stand.*, Basel, 32:185-91, 1975.
27. PRÉVOT, A.R. *Biologia des maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955. p.159-221.

28. REED, L.J. & MUENCH, H.A. A simple method of estimating fifth percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, 27(3): 493-7, 1938.
29. SEDDON, H.R. Bulbar paralysis in cattle due a toxicogenic bacillus. *J. Comp. Pathol. Ther.*, New York, 35(3):147-90, 1922.
30. SIMMONS, G.S. & TAMMENAGY, L. *Clostridium botulinum* type D as cause of bovine botulism in Quensland. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 40:123-7, 1964.
31. SMITH, L.D.S. *Botulism: The organisms, its toxins, the disease*. Springfield, Charles C. Thomas, 1977. 236p.
32. STERNE, M. & WENTZEL, L.M. A new method of the large scale production of high-titre botulism formol-toxoid types C and D. *J. Immunol.*, Baltimore, 65(2):175-83, 1950.
34. STEVENSON, J.W.; HELSON, V.; REED, G. B. Preparation of *Clostridium parobotulinum* toxins. *Can. J. Res. Scet. E. Med. Sci.*, Ottawa, 25:9-13, 1947.
35. SYUTO, B. & KUBO, S. Purification and crystalization of *Clostridium botulinum* type C toxin. *JPN. J. Vet. Res.*, Sapporo, 20(1/2):19-30, 1972.
36. TAMMEMAGY, L. & GRANT, K.M. Vaccination in the control bo vine botulism in Quensland. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 43 (9):368-73, 1967.
37. THE UNITED State Pharmacopeia. 16. ed. Washington, 1985. p. 30-1.
38. THEILER, A. The cause and prevention of lamsiekte. *J. Dep. Agric. South. Afr.*, Pretōria, 1:221-44, 1920.
39. TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; CARVALHO, E.B. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras. Ser. Vet.*, Brasília, 5:465-72, 1970.
40. VAN ERMENGEN, E. Veber einem neuen anaeroben Bacillun and

seine zun botulisms. *Z. Hyg. Infectionskn*, Heidelberg, 26:1-56, 1897 apud SOUZA, A.M. *Distribuição de esporos de Clostridium bovinos vítimas de botulismo em pastagens no sul de Goiás*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1985. 66p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).

41. WRIGHT, H.D. The importance of adequate reduction of peptons in the preparation of media for pneumococcus and other organism. *J. Pathol. Bacteriol*, Edinburgh, 37:257, 1933.
42. WRIGHT, G.G.; DUFF, J.T.; FIOCK, M.A.; DEVLIN, H.B.; SODERSTROM, R.L. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. V. Ditoxification of purified type A and type B toxins, and the antigenicity of univalent and polyvalent aluminum phosphate adsorbed toxoids. *J. Immunol.*, Washington, 84(3):384-9, 1960.