

Eduardo Henrique Moreira Lima

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE VACINAS ANTITETÂNICAS DE
USO VETERINÁRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 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
2006**

L732a Lima, Eduardo Henrique Moreira, 1977.
Avaliação da eficiência de vacinas antitetânicas de uso veterinário / Eduardo Henrique Moreira Lima. – 2006.
18p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

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

CDD – 636.089 5372

Dedico este estudo a Deus, aos meus maravilhosos pais, ao meu único irmão Sérgio, aos meus amores Alice e Henrique, meu grande mestre Francisco Lobato e a todos que se esforçam em busca de uma meta real.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por permitir minha vinda a esse mundo e poder desfrutar das ferramentas que ajudam a construir o homem cidadão.

Agradeço aos meus Pais que tanto se empenharam em minha criação, se dedicaram muito abrindo mão de tantas outras coisas para que nós pudéssemos construir minha vida e chegarmos até aqui.

Agradeço muito a minha fiel companheira Alice, minha esposa, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me incentivando, me estimulando a crescer e ajudando a elaborar um mundo melhor.

Em especial ao meu filho Henrique, que foi o combustível desta caminhada e será por toda a minha vida...

Ao meu único irmão, Sérgio Henrique, que nos momentos mais complicados esteve ao meu lado de verdade e agradeço principalmente as ajudas financeiras.

O agradecimento principal vai para o Dr. Francisco Lobato, meu professor, amigo, mestre, exemplo de vida, que me acolheu, me mostrou o caminho da ciência e me colocou nos trilhos. Minha gratidão por ele é inestimável.

Gostaria de agradecer a todos os médicos veterinários, em especial ao meu sogro Cornélio Junqueira Maciel, exemplo de tudo...

Agradeço a minha grande companheira de guerra Luciana Aramuni Gonçalves, tenho um apreço muito especial por ela e por tudo que já fez por mim.

Ao LANAGRO, FUNED, UFMG, ICB, Escola de Veterinária, EMBRAPA e a todas as instituições que contribuíram para minha formação.

A todos os discentes e docentes que estiveram e ainda estão ao meu lado, pois a vida não teria fundamento sem estas pessoas que estão ao nosso redor, nos fazendo estudar e crescer e compreender como o mundo realmente funciona.

Aos meus colegas do Laboratório de Bacteriose, várias gerações, em especial ao Felipe Masiero.

A todos os funcionários de todos os departamentos e instituições.

SUMÁRIO

	RESUMO	07
	ABSTRACT	07
1.	INTRODUÇÃO.....	08
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	09
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1.	Local de realização do experimento	11
3.2.	Animais	11
3.3.	Vacinas	11
3.4.	Amostras de <i>Clostridium tetani</i> , toxina, toxóide e antitoxina padrão.....	12
3.5.	Diluição do toxóide de referência	12
3.6.	Meios de cultura.....	13
3.7.	Cultivo e manutenção das sementes de <i>Clostridium tetani</i>	13
3.8.	Produção de toxina tetânica	13
3.9.	Seleção da semente e toxina	13
3.10.	Curva de crescimento das sementes de <i>Clostridium tetani</i> medida por densidade ótica.....	13 14
3.11.	Confirmação do tipo de toxina produzida e da toxina padrão	14
3.12.	Padronização da toxina padrão	14
3.13.	Inocuidade das vacinas	14
3.14.	Esterilidade das vacinas	14
3.15.	Esquema de vacinação e sangria dos coelhos e cobaios para avaliação do toxóide tetânico.....	14 14
3.16.	Teste de potência do soro	14
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.	CONCLUSÕES.....	17
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das vacinas contra clostridioses e controles utilizados	12
Tabela 2	Títulos de antitoxina tetânica em <i>pool</i> de soro de coelhos e cobaios vacinados ..	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Concentração celular de <i>Clostridium tetani</i> em DO a 600 nm, de acordo com o tempo de incubação (h)	15
----------	--	----

RESUMO

O tétano é uma síndrome neurológica infecciosa ocasionada pela ação da toxina tetânica, produzida por *Clostridium tetani*, que age no sistema nervoso central, caracterizando-se por um quadro de paralisia espástica. Neste trabalho foi avaliada a potência de oito vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *C. tetani*, pela titulação da antitoxina tetânica em soro de coelhos e cobaias vacinados através da técnica de soroneutralização em camundongos. As vacinas codificadas como T2, T4, T5 e T8 apresentaram, em coelhos e cobaias, títulos superiores ao nível mínimo exigido no teste de 2,5 UI/ml, recomendado para controle desse produto. As vacinas T1, T3, T6 e T7 não induziram títulos protetores. Os resultados demonstram que 50% das vacinas contra *C. tetani* testadas, comercializadas no Brasil, foram ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado.

Palavras-chave: clostridioses, tétano, toxina tetânica, vacina.

ABSTRACT

Tetanus is an infectious neurological syndrome caused by the action of the tetanus toxin, produced by *Clostridium tetani*, which acts in the central nervous system, characterizing itself for a spastic paralysis. The antibody response to the *C. tetani* component of eight commercial vaccines was evaluated by the mice serum neutralization test with rabbit and guinea pigs sera. The codified vaccines T2, T4, T5 and T8 induced titles of *C. tetani* antitoxin superior to the recommended minimum title of 2,5 IU/ml. The vaccines T1, T3, T6 and T7 did not induce protection titles. The 50% of the *C. tetani* vaccines commercialized in Brazil were unable to induce the minimum antibody response recommended for the approval of the product.

Key words: clostridiosis, tetanus, tetanus toxin, vaccine.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças bacterianas causadas por anaeróbios, as clostridioses estão entre as que mais preocupam os criadores devido às perdas econômicas que determinam.

Infecções clostridiais tomam muitas formas e permanecem como um problema comum para produtores, veterinários de campo e pesquisadores (Songer, 1997).

Clostridium tetani, microrganismo anaeróbio, faz parte do quadro dos agentes etiológicos responsáveis pelas clostridioses e é responsável pelo tétano. Encontra-se no trato digestivo dos animais e no solo e possui a propriedade de resistir na natureza por longos períodos na forma de esporos, tornando a erradicação da enfermidade praticamente impossível.

O tétano tem distribuição mundial e todas as espécies animais de interesse zootécnico são sensíveis à doença. Caracteriza-se por uma síndrome neurológica infecciosa ocasionada pela ação da toxina tetânica ou tetanospasmina, produzida por *C. tetani*, que age no sistema nervoso central. A toxina tetânica e a toxina botulínica são as mais potentes toxinas bacterianas conhecidas (Schiavo e Montecucco, 1997). Existe uma diferença de susceptibilidade ao tétano entre as espécies animais, por exemplo, os pássaros são refratários e os equinos são os mais susceptíveis.

A patogenia do tétano envolve a contaminação de feridas por esporos do microrganismo que encontram condições favoráveis, germinam e secretam a toxina. Pode ocorrer também o tétano idiopático, sem identificação da porta de entrada para o agente, com baixa incidência. A toxina tetânica é captada por terminações nervosas periféricas e, de maneira retrógrada, é transportada através do axônio até os neurônios motores espinhais. Nessas células é capaz de impedir a liberação de neurotransmissores, principalmente glicina, através da ocupação das fendas pré-sinápticas. Assim, a ausência do neurotransmissor, resulta em descargas

excitatórias contínuas e a contração muscular é mantida. Em alguns casos, não só os neurônios motores espinhais são acometidos, mas também estruturas nervosas autônomas.

O controle e a profilaxia do tétano devem basear-se em medidas adequadas de manejo e principalmente, na vacinação dos animais utilizando-se imunógenos eficientes, já que os animais estão em permanente contato com o agente e com os fatores que poderão desencadear a enfermidade. Animais vacinados pela primeira vez devem receber uma ou duas doses de reforço, independente da susceptibilidade da espécie. Em casos de intervenções cirúrgicas, os animais devem ser vacinados com antecedência de pelo menos seis semanas para desenvolverem a proteção adequada contra o tétano.

No Brasil são comercializadas vacinas clostridiais que são compostas por múltiplos antígenos e são usadas como estratégia frente a uma variedade de agentes e/ou suas toxinas. Essa tendência atual de se usar vacinas combinadas visa minimizar os problemas de manejo, estresse, reações anafiláticas locais e traumas nas inoculações, entretanto, o uso de vacinas com múltiplos antígenos pode interferir na eficiência das respostas imunológicas dos animais.

Trabalhos realizados por Lobato et al. (1998) com toxóides botulínicos dos tipos C e D, Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000) com vacinas contra *C. perfringens* tipo C e D, Balsamão (2001) com vacinas contra *C. sordellii* e Nascimento (2003) com vacinas contra *C. novyi* tipo B, demonstraram um baixo poder imunogênico das vacinas produzidas no Brasil.

Dentre os inúmeros antígenos clostridiais das vacinas comercializadas no país, somente *Clostridium chauvoei* e os toxóides botulínicos tipos C e D são testados oficialmente pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), portanto, a qualidade dos demais antígenos

é de responsabilidade das indústrias produtoras.

No período de 1991 a 2000, um bilhão cento e noventa e três milhões de doses de vacinas polivalentes contra clostridioses foram submetidos ao controle oficial, comprovando a grande utilização dessas vacinas por parte dos produtores rurais.

O aumento significativo na produção de imunobiológicos se deve à intensificação e modificação do sistema de exploração agropecuária ocorrida no Brasil, o que levou ao aparecimento de novas doenças e recrudescimento de outras.

O estabelecimento do Mercado Comum do Cone Sul – MERCOSUL – impõe aos países membros uma tomada de posição mais enérgica em relação ao controle de qualidade dos insumos agropecuários e produtos biológicos, entre os quais as vacinas, sobretudo em função do acelerado intercâmbio de animais entre esses países e, conseqüentemente, maior difusão de doenças.

Por essas razões faz-se necessário a introdução e padronização de testes para os outros antígenos presentes nas vacinas contra clostridioses que são comercializadas sem controle oficial.

Diante de uma produção e comercialização expressiva de vacinas contendo toxóide tetânico, bem como da importância da doença em relação à saúde animal, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a potência de vacinas clostridiais monovalentes e combinadas que contenham em sua composição toxóide tetânico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Clostridium tetani é uma bactéria Gram positiva em forma de bastonete, medindo em média 3,4 µm de comprimento por 0,5 µm de largura, com extremidades arredondadas e que forma frequentemente longos filamentos. Os esporos com forma

em plectrídio são o que dá ao bacilo esporulado o aspecto de alfinete ou baquetas de tambor (Bier, 1975).

O microorganismo é sensível as altas temperaturas e a presença de oxigênio. Os esporos, ao contrário, são resistentes ao calor e usualmente aos anti-sépticos. Podem sobreviver quando autoclavados a 121° C durante 10 a 15 minutos e são relativamente resistentes ao fenol e a outros agentes químicos.

C. tetani é o agente etiológico do tétano que é uma toxemia causada pela neurotoxina tetanospasmina produzida pela bactéria. Quase todos os mamíferos são suscetíveis a esta doença. Os pássaros são refratários, sendo que a dose letal para pombos e galinhas, por exemplo, é cerca de 300.000 vezes maior que a dose para um equino. Os equinos são os mais suscetíveis dentre as espécies domésticas de interesse veterinário. Em geral, a ocorrência de *C. tetani* no solo e a incidência do tétano no homem e no cavalo, são maiores nos locais mais quentes dos vários continentes.

C. tetani produz duas toxinas, a tetanospasmina e a tetanolisina. A tetanospasmina é responsável pelo quadro nervoso que causa necrose e lise de glóbulos sanguíneos, agravando e complementando o desenvolvimento da enfermidade (Demain et al, 2005).

A tetanospasmina, com peso molecular de 150 kDa é hidrolisada pelas peptidases de *C. tetani* em dois peptídeos de 53 e 107 kDa. Os peptídeos penetram nas células nervosas em grande quantidade e bloqueiam a realização da neurotransmissão de sinapses inibitórias. Esse bloqueio causa desregulação excitatória na atividade sináptica de neurônios, resultando em paralisia espástica (Demain et al., 2005).

A tetanospasmina, principal toxina tetânica, é uma potente neurotoxina que inibe a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas pré-sinápticas. A toxina é composta por uma cadeia pesada e uma leve que estão unidas via ponte

dissulfídica. A liberação da cadeia leve causa bloqueio da liberação do neurotransmissor. A cadeia leve pode agir como uma metaloprotease, demonstrando que o bloqueio da neurotransmissão pela toxina tetânica em terminações nervosas isoladas está associado com a proteólise seletiva da sinaptobrevina, uma membrana protéica integral de vesículas sinápticas. Nenhuma outra proteína parece ser afetada pela toxina tetânica. A clivagem da sinaptobrevina evidencia o mecanismo de ação molecular da toxina tetânica (Link et al. 1992).

A toxina tetânica se fixa na placa neuromuscular, produzindo diminuição do potencial pré-sináptico, ao ligar-se aos neurônios pré-sinápticos inibitórios, impede a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas no músculo. A progressiva diminuição da inibição neuronal resulta em desenvolvimento de um grau extremo de excitabilidade em todo o sistema nervoso, inclusive o autônomo. O bloqueio e a perda funcional de tais neurônios inibitórios fazem com que os neurônios motores aumentem o tônus muscular, produzindo rigidez e espasmo (Patiño, 1999).

Por mais expressiva e eficiente que seja a profilaxia, há vários anos o tétano continua ocorrendo, mesmo que esporadicamente. Embora não existam dados que discorram fielmente sobre números, é estimado que aproximadamente 70% dos animais acometidos morram a cada ano ocorrendo perdas significativas em animais de produção (Cox et al. 1995).

Hendriksen et al. (1994) estudaram técnicas para avaliar a potência do toxóide tetânico em vacinas simples e multivalentes para uso veterinário. As técnicas *in vitro* descritas, para detecção de títulos de anticorpos tetânicos, foram o ELISA indireto, teste de inibição da banda da toxina (ToBI) e a hemoaglutinação passiva (HA). A técnica *in vivo* citada foi a neutralização da toxina (TN) em camundongos. As técnicas *in vitro* e a TN foram capazes de detectar níveis de anticorpos que variaram entre 2,6 – 266 UI/ml.

Coplu et al. (2004), em um estudo soroepidemiológico, combinaram o método *in-house* ELISA com o teste de aglutinação de partículas (KPA) para comparar com o teste de neutralização da toxina em camundongos. Obtiveram resultados que comprovaram a alta correlação ($r=0,968$) entre a combinação das técnicas *in vitro* com o teste *in vivo*.

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

A prevenção das clostridioses nos animais por meio de vacinas é de uso rotineiro. Um esquema de vacinação correto é um instrumento para a prevenção da mortalidade ocasionada por essas 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 microrganismos do gênero *Clostridium* (Assis et al., 2001).

A eficiência das vacinas contra clostridioses relaciona-se à natureza dos antígenos que as compõe, sendo esses toxóides e/ou bacterinas. São altamente imunogênicas 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 toxinas produzidas pelos clostrídeos (Lobato e Assis, 2000).

No Brasil têm sido realizados estudos com vacinas contra clostridioses, para avaliação da qualidade das mesmas. Lobato (1989), ao avaliar as vacinas antibotulínicas comercializadas no país, 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 *C. perfringens* tipos C e D, constataram que nenhum dos produtos testados foram eficientes em estimular níveis mínimos de anticorpos protetores nos animais vacinados. Lobato et al. (2000), ao avaliarem seis toxóides de *C. perfringens* tipo C e D, 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 *C. sordellii* de vacinas comerciais, constatou que apenas três vacinas, entre doze testadas, estimularam resposta imune protetora contra desafio direto em cobaios. Nascimento (2003), ao avaliar as 13 vacinas que continham *C. novyi* tipo B, constatou que quatro vacinas protegeram os animais sendo duas com níveis de anticorpos acima do exigido pelo MAPA e duas com níveis abaixo da legislação brasileira, mas acima do exigido pela legislação dos Estados Unidos.

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 Farmacopéia Européia e do 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) e pela Instrução Normativa nº 23/02, essa última exclusiva para vacinas contra botulismo (Brasil, 2002).

A Farmacopéia Européia (1998) estabelece o nível mínimo de antitoxina tetânica de 2,5 UI/ml, determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos, em soros de cobaios e coelhos vacinados. Além desse teste, estabelece as provas de esterilidade e inocuidade.

Métodos alternativos têm sido estudados em substituição aos testes *in vivo*, como o teste de ELISA proposto por Wood (1991)

que avaliou o teste de potência para *C. novyi* tipo B, *C. perfringens* tipo D, *C. tetani* e *C. septicum* e encontrou correlação ($r=0,84$) com o teste de soroneutralização em camundongos. Segundo Wood (1991), as principais vantagens do teste de ELISA seria favorecer uma redução significativa no número de animais de laboratório e no tempo para realização dos testes, de setenta e duas horas no teste de soroneutralização em camundongos para três horas no teste de ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Bacteriose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Clostridioses, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Pedro Leopoldo/MG.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, de ambos os sexos, com peso entre 17 e 22 g e cobaios albinos (*Cavia porcellus*), da linhagem *English Short Ear*, de ambos os sexos, com peso entre 350 g e 450g, oriundos dos biotérios do LANAGRO de Pedro Leopoldo/MG e de Campinas/SP, respectivamente.

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

3.3. Vacinas

Foram adquiridas de forma aleatória, diretamente em estabelecimentos comerciais de produtos veterinários de Belo Horizonte/MG, oito vacinas de sete laboratórios que nos anos de 2004 e 2005 produziram e comercializaram vacinas que

apresentavam em sua composição toxóide tetânico.

Foram observadas as condições de armazenamento no local de revenda, como a temperatura entre 4° e 8°C, o prazo de validade das vacinas e demais especificações dos fabricantes.

Os laboratórios e as vacinas foram codificados para resguardar a identidade dos produtores. A Tabela 1 apresenta a composição antigênica das vacinas testadas.

3.4. Amostras de *Clostridium tetani*, toxina, toxóide e antitoxina padrão

Para a produção de toxinas foi utilizada uma semente de *C. tetani* 00175 lote 0695175, origem VB/Boston – Massachussets, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, e uma semente gentilmente cedida pelo Laboratório Labovet, Feira de Santana/BA.

Uma amostra de toxina tetânica foi produzida pelo Laboratório Labovet, padronizada ao nível de teste L+/10, com 300 UI, e cedida para os experimentos.

Como controle foi empregado toxóide de referência adsorvido e liofilizado, contendo 340 UI por ampola (International Laboratories for Biologicals Standards, World Health Organization), e antitoxina padrão liofilizada contendo 1000 UI, adquiridos junto à Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro/RJ.

3.5. Diluição do toxóide de referência

O toxóide tetânico de referência foi reconstituído em 34 ml de uma solução contendo 40% de salina fisiológica estéril 0,9% e 60% de glicerol a 1%, e padronizado a 10 UI/ml conforme modelo empregado pela Fiocruz/RJ para avaliação do toxóide tetânico humano.

Tabela 1: Composição das vacinas contra clostridioses e controles utilizados

Código	Laboratórios	Composição
T1	L1	<i>C. tetani</i>
T2	L2	<i>C. tetani</i>
T7	L2	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. haemolyticum</i>
T3	L3	<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. tetani</i>
T4	L4	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipo D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. tetani</i> , <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> , Moxidectina
T5	L5	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i>
T6	L6	<i>C. tetani</i>
T8	L7	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. haemolyticum</i>
T9	ILBS/WHO	Toxóide Padrão
T10	Controle	Solução Salina 0,85% (estéril)

3.6. Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldo BHI¹, caldo Tioglicolato¹, agar sangue base Muller-Hinton¹ com 5% de sangue eqüino (AS), caldo Sabouraud¹, meio para produção de toxina tetânica (Latham, 1962), PYG (Mozzer, 2004) e meio para produção de toxinas – MPT (Lobato et al., 2000).

3.7. Cultivo e manutenção das sementes de *Clostridium tetani*

As sementes liofilizadas foram reconstituídas pela adição de 2 ml de caldo Tioglicolato e semeadas em dois tubos (15 X 160 mm) contendo 10 ml do mesmo meio. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose (CO₂ – 9,8%; H₂ – 10,4%; N₂ – 79,8%). As amostras foram avaliadas quanto à pureza pelo teste respiratório, semeando-se 0,1 ml de cultura em duas placas de agar com 5% sangue de eqüino e incubando-se uma placa em anaerobiose, a 37°C por 48 horas, e a outra placa em aerobiose, a 37°C pelo mesmo tempo.

Para manutenção das amostras foram feitos inóculos em cinco tubos contendo 10 ml de Tioglicolato, que foram incubados a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Os cultivos obtidos foram centrifugados a 8000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi recuperado e armazenado para posterior verificação da presença de toxinas em camundongos, e o sedimento ressuspendido em solução de leite em pó a 10% e liofilizado (Rudge, 1983).

3.8. Produção de toxina tetânica

As culturas de *C. tetani* em tioglicolato foram semeadas na proporção de 10% de inóculo, em outros três tubos de rosca contendo 15 ml de tioglicolato, representando um volume final de 45ml, e

incubados em jarra de anaerobiose a 37°C por 48 horas. Esse procedimento foi repetido duas vezes. A produção de toxinas foi realizada a partir da transferência do inóculo obtido (45 ml) diretamente para 500 ml de meio Latham (1962), os quais foram incubados em anaerobiose a 37°C por sete dias.

A cultura obtida no meio Latham (1962) foi centrifugada a 8000 x g, por 30 minutos a 4°C, para a remoção de células e fragmentos. O sobrenadante foi concentrado 10 vezes a 4°C em célula de agitação Amicon, com membrana de ultrafiltração de celulose regenerada (Millipore Corporate, EUA), capacidade de retenção acima de 30kDa. As frações de toxina concentradas foram estocadas a – 80°C até o momento do uso.

Em todas as etapas, a pureza dos cultivos foi analisada por meio da técnica de coloração de Gram.

3.9. Seleção da semente e toxina

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao título de toxina produzida pela técnica de bioensaio em camundongos. Os sobrenadantes das culturas centrifugadas foram diluídos em solução salina peptonada a 1%, em escala decimal, até a diluição 10⁵. Foram inoculados 0,2 ml de cada diluição em cinco camundongos, pela via subcutânea, que foram observados por um período de 96 horas, para a verificação de ocorrência de morte.

3.10. Curva de crescimento das sementes de *Clostridium tetani* medida por densidade ótica

As duas sementes de *C. tetani*, após o primeiro cultivo em tubo, foram inoculadas (50 ml) em 500 ml de caldo Tioglicolato e incubadas em anaerobiose a 37°C por 20 horas. Foram coletadas alíquotas de 5 ml das culturas a cada hora e a concentração celular quantificada através da medida da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. As amostras foram lidas diretamente até

¹ Difco Laboratories, Detroit, EUA

valores de absorvância de aproximadamente 0,7. Acima desses valores, foram diluídas 1:10, em meio de cultura estéril, antes de se proceder a leitura. Multiplicou-se a DO pelo fator de diluição, obtendo-se, assim, a concentração celular (Mozzer, 2004).

3.11. Confirmação do tipo de toxina produzida e da toxina padrão

Para confirmação do tipo de toxina produzida por *C. tetani* foi empregada a metodologia descrita por Lobato (1989) com modificações, que consistiram na mistura de 1,0 ml de toxina, em diferentes diluições, com 1,0 ml de antitoxina padrão homóloga contendo 1,0 UI/ml. As misturas foram mantidas em banho-maria a 37°C por 60 minutos e em seguida inoculadas, no volume de 0,2 ml por animal, por via subcutânea em quatro camundongos que foram observados durante 96 horas. Como controles positivos foram inoculados toxina tetânica pura na mesma dose, diluição e via de inoculação.

3.12. Padronização da toxina padrão

O nível de teste empregado para padronização da toxina tetânica foi L+/10 (menor quantidade de toxina que quando misturada com 0,1 UI de antitoxina padrão homóloga, e injetada subcutaneamente em camundongos, causa morte dos animais até o quarto dia após a inoculação) (Farmacopéia Européia, 1998).

3.13. Inocuidade das vacinas

Para o teste de inocuidade das vacinas foram utilizados cinco cobaios por vacina. Os animais foram inoculados, por via subcutânea, com 5 ml de vacina dividido em duas doses iguais e injetados em locais diferentes (Farmacopéia Européia, 1998).

3.14. Esterilidade das vacinas

A esterilidade foi verificada pela inoculação de 0,5 ml de cada vacina em quatro tubos contendo 20 ml de caldo Tioglicolato e em quatro tubos contendo 20 ml de caldo Sabouraud. Metade dos tubos de cada um

dos inóculos em caldo Tioglicolato foi incubada em anaerobiose. Os demais tubos com caldo Sabouraud e com caldo Tioglicolato foram incubados em anaerobiose. Todos os tubos inoculados foram mantidos a 37°C, por 21 dias, com leituras diárias (Brasil, 2002).

3.15. Esquema de vacinação e sangria dos coelhos e cobaios para avaliação do toxóide tetânico

Para cada uma das vacinas foram utilizados oito coelhos e oito cobaios. No grupo controle positivo, os animais receberam inoculações contendo 0,75ml de toxóide de referência reconstituído. No grupo controle negativo, os animais receberam inoculações contendo solução salina 0,85%, estéril. Os outros oito grupos foram inoculados com as vacinas comercializadas no país.

Os animais estavam clinicamente saudáveis e foram tratados com ração balanceada, capim e água *ad libitum*, e foram mantidos separados de acordo com o sexo. Em todos os grupos, as inoculações foram feitas no dorso, por via subcutânea, sendo a primeira dose no dia zero e a segunda dose 28 dias após. O volume inoculado foi a menor dose recomendada pelo fabricante. Quatorze dias após a segunda dose, todos os animais foram submetidos à sangria total. Volumes iguais dos soros de cada animal, de cada grupo, foram misturados. As misturas de soros foram identificadas de acordo com o animal e o grupo, e armazenadas a -20°C, até a realização dos bioensaios em camundongos (Farmacopéia Européia, 1998).

3.16. Teste de potência do soro

O teste de potência foi determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos. Utilizou-se 1,0 ml de toxina contendo 1,0 UI/ml (10L+/10) misturado a 10 ml dos soros de coelhos e cobaios não diluídos, e nas diluições 1:2; 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20. Cada mistura foi homogeneizada, incubada a 37°C por 60 minutos, inoculada em dois camundongos na dose de 0,2 ml, via subcutânea, e os animais foram observados por 96 horas. Os resultados

foram interpretados de acordo com o recomendado pela Farmacopéia Européia (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas amostras de *Clostridium tetani*, utilizadas neste trabalho, apresentaram crescimento característico em agar sangue com colônias espalhadas sobre o agar. Foram observados nas lâminas coradas apenas bastonetes Gram-positivos não esporulados em formato de baquetas de tambor, característicos de *Clostridium tetani*. Não houve crescimento nas placas de agar sangue incubadas em aerobiose.

No sobrenadante das culturas foi confirmada a presença de toxina tetânica. Os animais inoculados com o sobrenadante sem antitoxina morreram entre 12 e 24 horas após inoculação.

Nos trabalhos de Lobato (1989) e Azevedo et al. (1998), que avaliaram a qualidade de vacinas comerciais contra *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D e *Clostridium perfringens* tipo C e tipo D, respectivamente, esses autores confirmaram os tipos de toxinas produzidas em seus experimentos, por essa técnica, a qual 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 com 48 horas de incubação em caldo Tioglicolato, que apresentou maior produção de gás, turbidez do meio de cultura e formação de precipitado nos tubos, quando comparado ao cultivo com 24 e 36 horas de incubação. Estes resultados foram também observados por Bier (1975) no crescimento e manutenção de amostras de *C. tetani*.

A leitura dos cultivos em DO foi crescente até 16 horas de incubação. Após esse tempo foi observada redução na concentração celular indicando início de degradação do meio de cultura (Figura 1).

Latham (1962) produziu toxina tetânica a partir de modificações no meio de produção citado por Mueller et al. (1954), com ausência do extrato de proteína animal, verificando um título de 70 a 90 Lf (limite de floculação).

Ozutsumi et al. (1984) pesquisou a produção de toxina tetânica e verificou resultados satisfatórios utilizando o meio de Latham (1962), obtendo títulos de toxina entre 360 – 390 Lf.

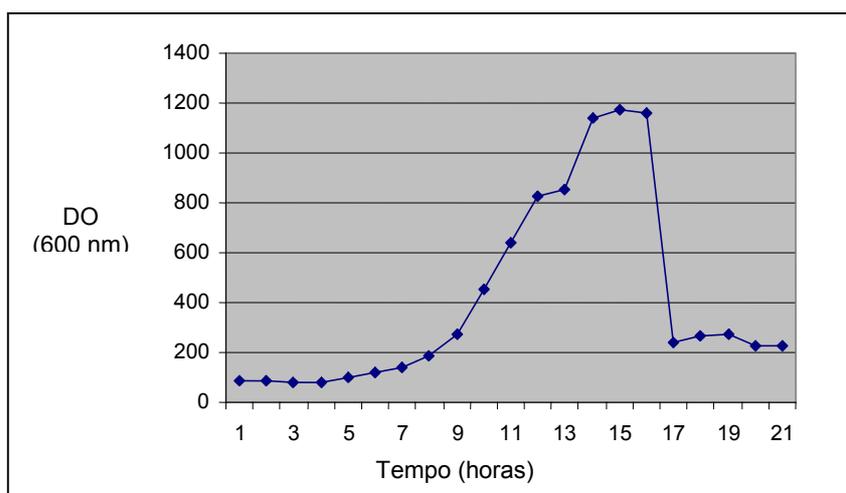


Figura 1 – Concentração celular de *Clostridium tetani* em DO a 600 nm, de acordo com o tempo de incubação (h).

Quando a vacina antitetânica para uso veterinário é apresentada como vacina combinada, isto é, contendo diferentes antígenos clostridiais reunidos, para o uso em outros animais que não eqüídeos, o teste de potência dos antígenos da vacina é preconizado em coelhos.

Segundo a Farmacopéia Européia (1998), a vacina é aprovada no teste de potência quando o título sorológico dos coelhos imunizados for igual ou superior a 2,5 UI/ml. Quando realizado em cobaios, o título do *pool* de soros não pode ser menor

do que 2,5 UI/ml de antitoxina padrão de *Clostridium tetani*, exceto quando a vacina é específica para o uso em eqüídeos, que deverá ter no teste de potência do *pool* de soros nada menos do que 30UI/ml.

Os títulos de anticorpos, para toxina tetânica, dos *pools* de soros de coelhos e de cobaios, no teste de SN em camundongos, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Títulos de antitoxina tetânica em *pool* de soro de coelhos e cobaios vacinados

Vacina	Título UI/ml (cobaios)	Título UI/ml (coelhos)
T1	-	-
T2	7,2	7,2
T3	-	-
T4	NT	6,0
T5	3,0	2,5
T6	-	-
T7	-	-
T8	5,6	5,0
Controle positivo	2,5	2,5
Controle negativo	-	-

NT = não testada

Em cobaios as vacinas T2, T5 e T8 apresentaram níveis de antitoxina tetânica de 7,2 UI/ml, 3,6 UI/ml, 20UI/ml, respectivamente, superiores ao nível mínimo exigido na Farmacopéia Européia (1998).

As vacinas T1, T3, T6 e T7 apresentaram níveis menores que 1UI/ml. A vacina T4 não foi testada em cobaios e quando inoculada causou óbito em cinco animais restando apenas três, consequentemente, saiu do modelo experimental traçado. A vacina em questão possui um componente denominado moxidectina, antiparasitário letal a essa espécie animal, por isso o teste em cobaios não é descrito.

Nos soros dos coelhos vacinados com T1, T3, T6 e T7 não foram detectados anticorpos protetores.

As vacinas T2, T4, T5 e T8 e o toxóide padrão induziram títulos de anticorpos em coelhos superiores ao título mínimo exigido.

Comparando-se os resultados obtidos para o *pool* de soros de coelhos e de cobaios (Tabela 2) podemos observar títulos iguais para a vacina T2 e valores aproximados para as outras vacinas que apresentaram resultados satisfatórios. Em ambos os resultados os títulos foram superiores ao título mínimo exigido.

Os estudos realizados no Brasil, por Lobato (1989), Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000), e os resultados deste trabalho, demonstraram que em sua maioria as vacinas contra clostrídeos produzidas no Brasil não induzem respostas imunes adequadas, portanto, não protegendo os animais.

Ressalta-se que o controle oficial das vacinas contra Botulismo, implantado em julho de 1994, no antigo Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MG, do MAPA, permitiu a implementação de ação oficial efetiva para avaliação deste imunógeno. Fato este, também ocorrido com o controle oficial de vacinas contra Carbúnculo Sintomático, pelo LARA/RS. Os controles citados permitem um maior rigor na garantia da qualidade das vacinas contra Botulismo e Carbúnculo Sintomático, comercializadas no Brasil e testadas oficialmente (Nascimento, 2003).

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, beneficiando toda a cadeia de produção da pecuária no Brasil.

CONCLUSÕES

A metodologia empregada para o controle das vacinas avaliadas neste experimento mostrou-se adequada, indicando sua aplicabilidade para o controle rotineiro de vacinas contra tétano.

Os resultados demonstram que 50% das vacinas contra *C. tetani* testadas, comercializadas no Brasil, foram ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado, indicando a necessidade urgente do controle da eficiência destes imunógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, R. A.; DIAS, L. D.; PARREIRAS, P. M. et al. Principais clostridioses dos ruminantes. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, Suplemento Técnico, v. 7, n. 22, p. 49-56, 2001.

AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. et al. Avaliação de vacinas contra *C. perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 3, p.239-242,1998.

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, Belo Horizonte.

BATTY, I.; GLENNY, A. T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxins and antitoxins. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 27, p.110-126, 1947.

BIER, O. *Bacteriologia e imunologia*. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. 1056 p.

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, SDA. Instrução Normativa n. 23, 18 de março de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 de março de 2002. Seção 1, p.10-11.

COPLU, N.; ESEN, B.; GOZALAN, A. et al. Tetanus Antibody Assay Combining In-House ELISA and Particle Agglutination Test and Its Serosurvey Application in a Province in Turkey. *Japanese Journal of Infection Disease*, v. 57, p.97-102, 2004.

COX, I. H. et al. Diseases of the Spinal Cord. In: KOBLUK, C. N., AMES, T. R., GEOR, R. J. *The Horse: Diseases and Clinical Management*. Saint Paul: Saunders, 1995. v. 2, p. 83-84 e p. 455-457.

DEMAIN, A. L.; GERSON, D. F.; FANG, A. Effective levels of tetanus toxin can be made in a production medium totally lacking both animal (e.g., brain heart infusion) and dairy proteins or digests (e.g., casein hydrolysates). *Vaccine*, v. 16, n. 23, p.46-47, 2005.

- EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3.ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.
- HENDRIKSEN, C. F. M.; WOLTJES, J.; AKKERMANS, A. M. et al. Interlaboratory Validation of in vitro Serological Assay Systems to Assess the Potency of Tetanus Toxoid in Vaccines for Veterinary Use. *Biologicals*, n. 22, p.257-268, 1994.
- LATHAM, W. C.; BENT, D. F.; LEVINE, L. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. *Applied Microbiology*, v. 10, n. 2, p.146-152, 1962.
- LINK, E.; EDELMANN, L.; CHOU, J. H. et al. Tetanus Toxin Action: Inhibition of Neurotransmitter Release Linked to Synaptobrevin Proteolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 189, n. 2, p.1017-1023, 1992.
- LOBATO, F. C. F. *Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil*. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LOBATO, F. C. F.; SILVA, N.; ALMEIDA, A. C. et al. Potência de toxóides botulínicos bivalentes C e D produzidos e comercializados no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 20, n.1, p.35-38, 1998.
- LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O. et al. 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, p.313-318, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, v. 19, n. 113, p. 29-33, 2000.
- MOZZER, O. D. *Cultivo do Clostridium botulinum tipo D em alta densidade visando à fabricação de vacinas veterinárias*. 2004. 149f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NASCIMENTO, R. A. P. Avaliação da eficiência de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. 2003. 33f Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines: principles of Veterinary Vaccine Production*. Paris: OIE - Office International des Epizooties, 2000. 957p.
- OZUTSUMI, K.; SUGIMOTO, N.; MATSUDA, M. Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxin. *Applied Environment Microbiology*, v. 49, n. 4, p.939-943, 1985.
- PATIÑO, J. F. Manejo del Tetanos: oficina de Recursos Educativos, Colômbia: Fepafem, 1999.
- RUDGE, R. H. Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods. London: J.J.S. Snell, 1983. Cap. 4, p.23-34.
- SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxin. In: *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 18, p.295-322.
- SONGER, J. G. Clostridial diseases of animals. In: *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 10, p.153-182.
- WOOD, K. R. One alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency test for the *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* tipo B and *Clostridium perfringens* tipo D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals*, n. 19, p. 281-286, 1991.