

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE BOVINOS VACINADOS
CONTRA O *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* AVALIADA PELOS
TESTES DE AGLUTINAÇÃO EM PLACA E ELISA**

Rafael Ferreira de Araujo

Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE BOVINOS VACINADOS
CONTRA O *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* AVALIADA PELOS
TESTES DE AGLUTINAÇÃO EM PLACA E ELISA**

Rafael Ferreira de Araujo

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2009

Araujo, Rafael Ferreira
A663r Resposta sorológica de bovinos vacinados contra o *Clostridium chauvoei* avaliada pelos testes de aglutinação em placa e Elisa /
Rafael Ferreira de Araujo. – Jaboticabal, 2009
xvii, 58 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra
Banca examinadora: Samir Issa Samara, Vera Cláudia Lorenzetti
Magalhães Curci
Bibliografia

1. Carbúnculo sintomático. 2. Bovinos. 3. Resposta sorológica. I.
Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL FERREIRA DE ARAUJO – nascido no Rio de Janeiro, RJ, em 13 de dezembro de 1979. Filho de Paulo Sergio Simões de Araujo e Regina Lucia Ferreira de Araujo. Médico Veterinário graduado em 2005 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Em 2006 obteve o título de Especialista em Sanidade de Ruminantes pela Universidade do Grande Rio. Iniciou o curso de Mestrado em 2007, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Jaboticabal, no programa de pós-graduação de Medicina Veterinária, na área de Medicina Veterinária Preventiva.

“O dia que o Homem compreender os sentimentos dos animais saberá que quando cometer um crime contra um animal estará cometendo um crime contra a Humanidade.”

Autor desconhecido

*Aos meus pais, Paulo e Regina, pelo apoio, confiança e
incentivo à minha formação.*

*Com eterna gratidão,
OFEREÇO este trabalho.*

*À minha namorada Sheila
e à minha grande amiga de todos os momentos (Rahya),
pelo apoio, incentivo, companheirismo
e principalmente compreensão nos momentos de ausência
DEDICO*

HOMENAGEM
À minha família,
e em especial ao avô Jaime (in memoriam)
pelo carinho compartilhado

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, pela confiança, amizade e pelos ensinamentos na elaboração deste trabalho.

À Rosa Maria Moraes Ferreira, pela paciência, amizade, ensinamentos e pelo constante apoio profissional.

À Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva, pelas sugestões e pela colaboração na realização do teste de Elisa e análise *Bayesiana*.

À Profa. Dra. Cáris Maroni Nunes, pelas sugestões e pela colaboração na realização da produção e dosagem de proteínas dos antígenos.

À Profa. Dra. Sílvia Helena Venturolli Perri, pela realização das análises estatísticas e sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da FCAV - Unesp (Jaboticabal), da Área de Medicina Veterinária Preventiva, pela receptividade e pelos ensinamentos.

Aos colegas da Pós-Graduação de Jaboticabal e Araçatuba pelos momentos compartilhados.

Aos técnicos Adão, Pedro, Gilmar, Alessandra e Alexandre, pelo auxílio na realização do trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Locais de realização do trabalho.....	17
4.2 Vacinas comerciais	17
4.3 Grupos experimentais.....	18
4.3.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses.....	18
4.3.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros.....	18
4.3.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos	19
4.4 Coleta e armazenamento do soro.....	19
4.5 Soros controles.....	19
4.6 Cepas de <i>Clostridium chauvoei</i>	20
4.7 Teste de Aglutinação em Placa.....	20
4.7.1 Produção do antígeno de <i>Clostridium chauvoei</i>	20
4.7.2 Procedimento do teste.....	21
4.8 Teste de Elisa.....	23
4.8.1 Produção do antígeno de <i>Clostridium chauvoei</i>	23
4.8.2 Procedimento do teste.....	23

4.9 Análise Estatística.....	25
4.9.1 Análise estatística convencional.....	25
4.9.2 Análise estatística <i>Bayesiana</i>	25
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Teste de Aglutinação em Placa.....	28
5.1.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses.....	28
5.1.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros.....	29
5.1.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos.....	32
5.2 Teste de Elisa.....	32
5.2.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses.....	32
5.2.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros.....	35
5.2.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos.....	38
5.3 Análise <i>Bayesiana</i>	39
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS.....	50
9 ANEXOS.....	56
9.1 Teste de Aglutinação em Placa.....	56
9.1.1 Anexo I - Meio de cultura.....	56
9.1.2 Anexo II - Solução salina tamponada.....	56
9.2 Teste de Elisa.....	57
9.2.1 Anexo III - Soluções utilizadas na produção do antígeno de <i>Clostridium chauvoei</i>	57
9.2.2 Anexo IV - Soluções utilizadas na padronização e no procedimento do teste.....	57

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Quantidade da mistura antígeno-soro para o teste de aglutinação em placa.....	22
Tabela 2. Procedimento de diluição do soro para o teste de aglutinação em placa.....	22
Tabela 3. Interpretação do título para o teste de aglutinação em placa.....	22
Tabela 4. Média geométrica dos títulos da resposta sorológica contra o <i>Clostridium chauvoei</i> de bezerros induzidos com uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses, avaliados pelo teste de aglutinação em placa.....	29
Tabela 5. Média geométrica dos títulos da resposta sorológica passiva contra o <i>Clostridium chauvoei</i> de bezerros cujas mães foram induzidas com duas vacinas comerciais polivalentes (V2 e V3) contra clostridioses, avaliados pelo teste de aglutinação em placa.....	30
Tabela 6. Coeficiente de correlação linear entre os dias de vacinação das mães e de nascimento dos bezerros para o teste de aglutinação em placa e as cepas de referência (MT) e de campo (SP).....	30
Tabela 7. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra o <i>Clostridium chauvoei</i> de bezerros induzidos com uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses, avaliados pelo teste de Elisa.....	33

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica passiva (DO) contra o <i>Clostridium chauvoei</i> de bezerros cujas mães foram induzidas com duas vacinas comerciais polivalentes (V2 e V3) contra clostridioses, avaliados pelo teste de Elisa.....	35
Tabela 9. Coeficiente de correlação linear entre os dias de vacinação das mães e de nascimento dos bezerros para o teste de Elisa e as cepas de referência (MT) e de campo (SP).....	37
Tabela 10. Parâmetros obtidos pela interferência <i>Bayesiana</i> após 9.500 interações com os valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) calculados para o teste de aglutinação em placa.....	39
Tabela 11. Parâmetros obtidos pela interferência <i>Bayesiana</i> após 9.500 interações com os valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) calculados para o teste de Elisa indireto.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos passivos maternos avaliados pelo teste de aglutinação em placa para a cepa de referência (MT) de <i>Clostridium chauvoei</i> , em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.....	31
Figura 2. Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos passivos maternos avaliados pelo teste de aglutinação em placa para a cepa de campo (SP) de <i>Clostridium chauvoei</i> , em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.....	31
Figura 3. Resposta sorológica (DO) para a cepa de referência (MT) de <i>Clostridium chauvoei</i> em bovinos, induzida por uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses em três protocolos distintos de vacinação (G1, G2 e G3), e avaliados pelo teste de Elisa em diferentes momentos.....	34
Figura 4. Resposta sorológica (DO) para a cepa de campo (SP) de <i>Clostridium chauvoei</i> em bovinos, induzida por uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses em três protocolos distintos de vacinação (G1, G2 e G3), e avaliados pelo teste de Elisa em diferentes momentos.....	34
Figura 5. Imunidade natural passiva para a cepa de referência (MT) de <i>Clostridium chauvoei</i> em bezerros até 90 dias de idade, avaliada pelo teste de Elisa.....	36
Figura 6. Imunidade natural passiva para a cepa de campo (SP) de <i>Clostridium chauvoei</i> em bezerros até 90 dias de idade, avaliada pelo teste de	

Elisa.....	36
Figura 7. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) pelo teste de Elisa para a cepa de referência (MT) de <i>Clostridium chauvoei</i> , em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R2).....	37
Figura 8. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) pelo teste de Elisa para a cepa de campo (SP) de <i>Clostridium chauvoei</i> , em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R2).....	38
Figura 9. Distribuição dos valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e Prevalência (pi) após 9.500 interações com distribuição unimodal para o teste de aglutinação em placa (valores x = percentagem; y = densidades).....	40
Figura 10. Distribuição dos valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) após 9.500 interações com distribuição unimodal para o teste de Elisa indireto (valores x = percentagem; y = densidades).....	41

RESPOSTA SOROLÓGICA DE BOVINOS VACINADOS CONTRA O *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* AVALIADA PELOS TESTES DE AGLUTINAÇÃO EM PLACA E ELISA

RESUMO – O carbúnculo sintomático é um problema sanitário mundial, responsável por elevados coeficientes de mortalidade em bovinos e ovinos. A imunização dos animais jovens, seguida de reforço anual até 2,5 anos de idade, é a principal medida profilática. Foram realizados três experimentos distintos com intuito de avaliar as respostas sorológicas de bovinos vacinados contra o carbúnculo sintomático, pelos testes de aglutinação em placa e Elisa, empregando-se como antígenos a cepa de referência (MT) e uma cepa de campo (SP). No primeiro experimento, os bezerros foram organizados em três grupos (G1, G2 e G3) e submetidos a três protocolos distintos de vacinação empregando-se uma vacina comercial polivalente contra clostridioses. O G1 foi primovacinado aos 4 meses de idade e recebeu o reforço na desmama (8 meses). O G2 recebeu a primeira dose na desmama e reforço 30 dias após. O G3 foi vacinado somente na desmama. As coletas de soro foram realizadas aos 4, 8, 9 e 10 meses de idade dos bezerros. O G1 apresentou a melhor resposta sorológica em comparação aos outros dois protocolos. Quando a avaliação dos grupos foi realizada aos 10 meses de idade, independente do protocolo empregado, a resposta sorológica foi similar. No segundo experimento, foi avaliada a imunidade natural passiva de bezerros, filhos de vacas vacinadas até 30 dias antes do parto (2ª dose), empregando-se duas vacinas comerciais polivalente contra clostridioses. As coletas de soro foram realizadas aos (±)7, 45 e 90 dias de idade dos bezerros. Independente das vacinas empregadas na imunização ativa das mães, a resposta sorológica passiva dos bezerros avaliados foi similar até os 3 meses de idade. Houve uma correlação linear da resposta sorológica passiva dos bezerros com a data de vacinação das mães e o dia do parto quando empregado o teste de Elisa. No terceiro experimento, as 30 vacas Nelore com idade superior a 4 anos e sem histórico de vacinação contra o carbúnculo sintomático havia pelo menos 2 anos apresentaram resposta sorológica contra o *Clostridium chauvoei*. A resposta sorológica dos bovinos foi significativamente inferior quando empregada a cepa de campo (SP) como antígeno em dois momentos da

avaliação no G3 do primeiro experimento, em dois no V2 do segundo experimento e no terceiro experimento do teste de aglutinação em placa. Quando empregado o teste de Elisa, tal situação foi constatada em dois momentos no G1, um no G3 e três no controle do primeiro experimento, e um no controle do segundo experimento. A resposta sorológica dos bovinos foi significativamente inferior quando empregada a cepa de referência (MT) como antígeno em um momento da avaliação no G1 e outro no G2 do primeiro experimento, e no terceiro experimento do teste de Elisa. De acordo com a análise *Bayesiana*, independente dos testes empregados na mensuração da resposta sorológica dos bovinos, os valores de sensibilidade e prevalência de anticorpos foram similares e a análise de concordância foi superior a 90%.

Palavras-Chave: carbúnculo sintomático, *Clostridium chauvoei*, bovinos, resposta sorológica, vacina, teste de aglutinação em placa, teste de Elisa, análise *Bayesiana*.

**SEROLOGICAL RESPONSE FROM VACCINATED BOVINES AGAINST
CLOSTRIDIUM CHAUVOEI BY THE USE OF AGGLUTINATION AND ELISA
METHODS**

ABSTRACT – Black leg disease is one of the most important sanitary problem, responsible for high levels of mortality observed in bovines and ovines herds. The vaccination of young animals, followed by annual booter until 2,5 years-old, is the major preventive measure against outbreaks. Three distinct experiments were conducted to measure the vaccinal response from bovines. The vaccinal strains used were the reference MT and field *Clostridium chauvoei* isolated. Sera from vaccinated animals were tested by agglutination and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa), both standardized for the present study. First experiment, calves were divided into three groups (G1, G2 and G3); and submitted to three vaccination schedule with a polyvalent vaccine. The G1 received first vaccine at 4 months of age and a subsequent booster after calving (8 month-old). The G2 received first vaccine dose after calving and booster at 30 days after. The G3 received only one vaccine dose at 8 months. The sera were collected at 4, 8, 9 and 10 months for all groups studied. The G1 group showed the best serological response at 10 months of age in comparison to G2 e G3 and control. Moreover, at 10 months of age all groups presented similar levels of serological response. The second experiment, the natural immunity of calves, separated from their mothers vaccinated 30 days before calving with two polyvalent vaccines. The respective serum was collected at (\pm) 7, 45 and 90 days of age. All calves presented similar serological response at 3 months of age, independent of vaccinal strain used. The third experiment, 30 heifers, Nelore race, aged above 4 years-old, without vaccination against black leg, were vaccinated with two *Clostridium* strains. When the SP strain was used the serological response was considered good in G3 (first experiment), second and third experiment for agglutination assay. To compare both techniques, agglutination and Elisa, inference Bayesian was performed, resulting in agreement of 90% in the results tested.

Key words: Black leg, *Clostridium chauvoei*, bovines, serological response, vaccine, agglutination test, Elisa assay, Bayesian test.

1 INTRODUÇÃO

O carbúnculo sintomático é uma enfermidade não contagiosa causada pela ativação de esporos latentes do *Clostridium chauvoei* na musculatura dos animais. É uma clostridiose que acomete principalmente ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos em menor proporção, e esporadicamente eqüinos e suínos. A enfermidade apresenta curso clínico agudo ou superagudo, geralmente fatal, caracterizando-se por uma miosite necrosante associada com celulite gangrenosa localizada. Nos bovinos e ovinos, o termo comumente empregado é manqueira, e trata-se de infecção endógena pelo *Clostridium chauvoei*. Nas demais espécies, é denominada de gangrena gasosa e ocorre como consequência de uma infecção de ferimentos pelo microrganismo.

Esta clostridiose é um problema sanitário universal dos bovinos e ovinos, sendo reconhecida como doença distinta em 1790 por Chabert e denominada pelo mesmo de carbúnculo sintomático. Um aspecto epidemiológico relevante sobre a enfermidade é a ocorrência em animais jovens, com idade variando entre 9 meses e 2,5 anos, sendo raramente observada em outras categorias.

A imunização contra o carbúnculo sintomático é uma medida profilática das mais importantes na bovinocultura e ovinocultura. Essa prática é executada desde o século XX; no Brasil, segundo dados atuais fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), são comercializadas anualmente cerca de 150 milhões de doses de vacinas apresentadas nas formulações monovalentes ou polivalentes. Cabe ressaltar que a vacinação é voluntária, indicando o reconhecimento sobre a importância e necessidade desta medida preventiva nos sistemas de produção da bovinocultura e ovinocultura nacional. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo a Portaria Nº 49, realiza o controle das partidas de vacinas comercializadas quanto à valência do *Clostridium chauvoei*. No entanto os critérios visam basicamente verificar a inocuidade, a esterilidade e se as vacinas atendem aos requisitos do teste de eficiência em cobaias, utilizando-se no desafio uma cepa oficial denominada MT (Manguinhos e Teixeira).

Os laboratórios produtores de vacinas contra clostridioses têm desenvolvido produtos biológicos direcionados à quantidade numérica de antígenos e problemas específicos de características regionais ou esporádicos. Contudo o Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da Unesp, *Campus* de Araçatuba, tem registros relacionados à ocorrência de surtos de carbúnculo sintomático em rebanhos sabidamente vacinados. Em diversas ocasiões têm sido registrados surtos da enfermidade, com diagnóstico etiológico, após alguns meses da vacinação de reforço em animais primovacinados. Essa situação indica uma eventual possibilidade de variações antigênicas entre as cepas vacinais e as de campo ou, ainda, um problema relacionado com a eficiência das vacinas frente a desafios naturais. Além disso, não existem testes sorológicos capazes de mensurar a resposta imunológica necessária para garantir uma proteção adequada dos animais frente ao desafio natural. O fato de a enfermidade não ser de notificação obrigatória, aliado a pouca abrangência da vigilância epidemiológica do país, contribui para a ausência de discussões sobre a problemática.

A escassez de estudos sistemáticos relacionados à mensuração da resposta sorológica bovina contra o *Clostridium chauvoei* estimulada pela vacinação, o aumento progressivo na produção e no consumo das vacinas, e a importância econômica e sanitária da manqueira motivaram o presente estudo, que se propôs a avaliar a resposta sorológica de bovinos vacinados contra o *Clostridium chauvoei* pelos testes de aglutinação em placa e Elisa, empregando-se como antígeno uma cepa de referência (MT) e uma cepa de campo (SP).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Clostridium* pertence ao grupo de bactérias anaeróbias estritas, Gram-positivas, em forma de bacilo, geralmente encontradas isoladas, ocasionalmente aos pares ou pequenas cadeias; também são formadoras de esporos, móveis e flageladas. Habitam o trato digestivo do homem e dos animais e podem ser isoladas de vísceras de animais sadios. Os esporos são encontrados em pastagem, solo, água e alimentos de origem animal e vegetal (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

O carbúnculo sintomático é uma enfermidade infecciosa causada pelo *Clostridium chauvoei*, acometendo principalmente bovinos e ovinos, ocasionalmente caprinos, e esporadicamente suínos, eqüinos, camelos e cervos (STERNE, 1981). Os surtos da doença em bovinos ocorrem principalmente de forma sazonal, após as chuvas nos períodos de outono e verão, apresentando uma distribuição regional e em blocos, podendo uma mesma região apresentar localidades com ocorrência da infecção clínica e outras sem sinais clínicos (BAGADI, 1978).

A diferenciação do *Clostridium chauvoei* de outras espécies de clostrídios por meio de cultivo em meios sólidos é extremamente difícil, pois este apresenta variadas formas de crescimento, e a fermentação de carboidratos é inespecífica, sendo necessárias outras provas complementares (LIMA, 1992).

A imunofluorescência é um método rápido e eficiente para identificação, quando se tem disponível comercialmente fluoresceína conjugada ao anticorpo específico para *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordelli*, com a vantagem de não propiciar reação cruzada (BISPING & AMTSBERG, 1988; QUINN et al., 1994).

No entanto, a identificação do *Clostridium chauvoei* pela reação de cadeia da polimerase (PCR) demonstra um resultado superior quando comparado ao da imunofluorescência (KUHNERT et al., 1997).

Os antígenos de *Clostridium chauvoei* são divididos em dois grupos distintos: antígenos celulares e antígenos solúveis. Os antígenos celulares são classificados em antígenos somáticos (O) termoestáveis, comuns a todas as cepas, e antígenos

flagelares (H) termolábeis, sendo dois distintos (MOUSSA, 1959). Os antígenos somáticos incluem antígeno aglutinogênico, antígeno O termoestável, antígeno não aglutinogênico, e o antígeno termolábil que não apresenta os antígenos O e H (CRICHTON et al., 1990).

A estrutura antigênica de cepas bovinas e ovinas de *Clostridium chauvoei* tem sido estudada por reações de aglutinação, absorção de aglutininas O e H. Sabe-se que o componente O é comum a cepas isoladas tanto de ovinos quanto de bovinos, mas o componente H é específico para cada tipo, bovino ou ovino (ROBERTS, 1931). As cepas de *Clostridium chauvoei* possuem um antígeno somático comum e dois antígenos flagelares distintos (ROBERTS, 1931; HENDERSON, 1932). O segundo antígeno flagelar é restrito a cepas isoladas de ovinos (HENDERSON, 1932).

O *Clostridium chauvoei* produz pelo menos cinco antígenos solúveis (enzimas) e mais uma enzima necrótica: hemolisina oxigênio-estável (alfa); desoxirribonuclease (beta); hialuronidase (gama); hemolisina oxigênio-lábil (delta); e uma neuraminidase. Outros produtos solúveis identificados em sobrenadantes de culturas incluem um fator produtor de edema e um componente imunizante (CRICHTON et al., 1990). Relatos de TILLERAY e KNIGHT (1986) sugeriram que culturas filtradas contêm uma ordem marcadamente heterogênea de proteínas. Enquanto a função biológica de antígenos solúveis de *Clostridium chauvoei* não tem sido estabelecida, há evidências de estudos de outros gêneros de bactérias para suportar a visão de que, coletivamente, essas moléculas funcionam como fatores de virulência. Os antígenos solúveis aumentam a habilidade das cepas virulentas de invadirem e se multiplicarem nos tecidos de seus hospedeiros suscetíveis (CRICHTON et al., 1990).

Os antígenos solúveis de *Clostridium chauvoei* são menos tóxicos que os antígenos solúveis de outras espécies de clostrídios causadores de gangrena gasosa (CRICHTON et al., 1990). De acordo com KERRY (1967), as toxinas poderiam ser imunologicamente importantes.

O modo de infecção pelo *Clostridium chauvoei* não está totalmente estabelecido. Acredita-se que ocorra infecção após a ingestão de esporos do solo ou da água contaminados concomitante a época de erupção dentária. Os esporos ingeridos

atravessariam o lúmen intestinal, atingiriam o sistema circulatório e linfático, para então serem distribuídos aos tecidos e órgãos de todo o corpo, inclusive na musculatura, onde permaneceriam latentes por longo período (KERRY, 1964; SMITH & WILLIAMS, 1984). Trata-se, portanto, de uma infecção endógena, em que os esporos permanecem quiescentes na musculatura por longos períodos.

A principal fonte de infecção parece ser carcaça de animais mortos pelo carbúnculo e a subsequente contaminação da pastagem, bebedouros, currais e galpões. Uma determinada área, quando contaminada, permanece assim durante anos. A transmissão direta de animal para animal não ocorre. Os animais com idade variando entre 9 meses e 2,5 anos, submetidos ao sistema de confinamento, apresentam uma alta suscetibilidade à infecção. Bovinos de crescimento rápido e alto padrão alimentar são mais suscetíveis que animais subnutridos (SMITH & WILLIAMS, 1984).

A patogenia do *Clostridium chauvoei* é desconhecida. Acredita-se que um processo traumático na musculatura resulte em áreas de baixo potencial de oxirredução, favorecendo a germinação e a multiplicação dos esporos latentes. As células vegetativas crescem, fermentam o glicogênio, digerem proteínas e produzem exotoxinas e gases (STEPHEN & PIETROWSKI, 1986), e matam os animais devido ao choque tóxico.

Em alguns casos, podem ocorrer lesões no miocárdio em função da mudança causada pelo alto nível de cortisol e catecolaminas em resposta ao estresse, fazendo com que os esporos latentes no músculo cardíaco germinem e se multipliquem, produzindo as lesões (GLASTONBURY et al., 1988).

Os sinais clínicos iniciais da doença são de difícil observação, pois seu curso é muito rápido, portanto a maioria dos bovinos morre e uma pequena parcela de ovinos se recupera (HENNING, 1956; SIPPEL, 1972; STERNE, 1981).

Os sinais, quando observados, compreendem hipertermia, depressão, anorexia, estase ruminal, rigidez muscular seguida de claudicação. Os grupos musculares mais afetados são os músculos dos membros posteriores, músculos da paleta e musculatura lombar. Caso os músculos afetados sejam superficiais, há um inchaço subcutâneo e uma crepitação local devido à produção de gás. Este inchaço tende a aumentar de

tamanho, sendo inicialmente quente e dolorido, passando a frio e indolor numa fase posterior. Quando os animais deitam, há ocorrência de dispnéia e pulso acelerado (STERNE, 1981).

Em casos de sítios de lesões por aplicação de produtos contaminados por *Clostridium chauvoei*, há formação de edema e crepitação, que se estende rapidamente, causando exsudação de líquido sero-sanguinolento através da pele, com odor rançoso. Nestes casos, a morte ocorre até 18 horas após a injeção com agulha contaminada (STERNE, 1981).

Alterações clínico-patológicas variam desde aumento de enzimas associadas à lesão muscular, como a creatina-quinase, até um hemograma indicando choque tóxico (PEMBERTON et al., 1974).

Animais mortos pela doença entram em rápida putrefação e são encontrados normalmente inchados e com extravasamento de líquidos sanguinolentos pelas cavidades naturais. Quando é possível realizar a necropsia, o tecido subcutâneo, o tecido intermuscular e outros próximos ao local afetado apresentam-se distendidos por um fluido edematoso amarelo, parcialmente hemorrágico e com bolhas de gás (miosite hemorrágica). Ao corte, há exsudação de líquido avermelhado e de odor rançoso. Os músculos acometidos são ressecados no centro da lesão e há comprometimento dos linfonodos regionais, que ficam hiperêmicos e edemaciados. Um fluido seroso avermelhado é encontrado freqüentemente nas cavidades torácica e abdominal, e os pulmões estão geralmente edemaciados e hiperêmicos. Quando o miocárdio está lesado, ocorre pericardite fibrinosa a fibrino-hemorrágica e trombos murais nas câmaras cardíacas (HENNING, 1956).

Histologicamente encontra-se extensa área de necrose proveniente das toxinas bacterianas e do envolvimento vascular. Hemorragias, bolhas de gás, diversos organismos clostridiais e ausência de resposta inflamatória são características do carbúnculo (HULLAND, 1993). As lesões de gangrena gasosa em ovinos e eqüinos são semelhantes às lesões dos bovinos que morrem de carbúnculo (GLASTONBURY et al., 1988; HAGEMOSER et al., 1980).

A imunidade protetora contra *Clostridium chauvoei* é geralmente considerada antibacteriana, em menor proporção antitóxica. (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1970; CRICHTON et al., 1990).

Durante o cultivo do *Clostridium chauvoei*, a concentração de toxinas protéicas e outros antígenos indutores de proteção produzidos variaram de acordo com a cepa utilizada. As bactérias e o filtrado de meio fluido no qual elas cresceram foram imunogênicos (CLAUS & MACHEAK, 1972a; STEVENSON & STONGER, 1980). A imunização com culturas totais formolizadas produziram altos níveis de imunidade protetora, provavelmente estimulada pelo antígeno protetor termolábil, presente na parede celular do microrganismo (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1970; CHANDLER & HAMILTON, 1975).

A antigenicidade da cepa CH3 de *Clostridium chauvoei* foi estimulada pelos antígenos termolábeis, pH sensível e antígeno somático não aglutinogênico, não houve a participação do antígeno flagelar termolábil (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1974).

A imunidade contra infecções por *Clostridium chauvoei* foi derivada de frações antigênicas de células purificadas (somáticas e flagelares) e frações antigênicas solúveis. Vacinas formuladas com componentes purificados demonstraram ser tão efetivas quanto às vacinas celulares. Vacinas de *Clostridium chauvoei* compostas por um coquetel heterogêneo de antígenos solúveis e celulares estimulou uma resposta sorológica heterogênea em um animal imunizado por esse tipo de vacina. Assim, a resposta sorológica a um antígeno individual não deveria ser empregada para mensurar a potência das vacinas (CRICHTON et al., 1990).

Estudos laboratoriais indicaram que vacinações com culturas completas de *Clostridium chauvoei* apresentaram uma melhor imunogenicidade em cobaias que a vacinação com lavado de células bacterianas, em ambas as preparações contendo o mesmo número de células (CLAUS & MACHEAK, 1972a).

As células bacterianas e as culturas filtradas (contendo antígenos celulares e toxinas) possuíram propriedades antigênicas. Conseqüentemente, as vacinas deveriam ser preparadas com culturas formolizadas de *Clostridium chauvoei* (STEVENSON & STONGER, 1980).

A extração ácida de células bacterianas de *Clostridium chauvoei* acompanhada de purificação seletiva do flagelo bacteriano possibilitou a preparação do antígeno de extrato ácido, cuja capacidade foi induzir uma melhor imunidade nas cobaias (STEVENSON & STONGER, 1980).

A antigenicidade do *Clostridium chauvoei* não sofreu influência da temperatura durante o cultivo da bactéria. Entretanto o fornecimento parcial e fracionado de glicose associado ao pH controlado afetaram negativamente a capacidade de indução de imunidade do extrato celular. Dessa forma, a limitação na fonte de carbono influenciou a antigenicidade das células bacterianas. Para obtenção de antígenos com propriedades imunogênicas tornaram-se importantes as seguintes medidas: temperatura de 37°C; fornecimento parcial de glicose (5 g) uma única vez; e não houve necessidade de um pH controlado (CORTIÑAS et al., 1994).

A imunogenicidade do flagelo pôde ser comprovada pelo aumento da resposta sorológica de camundongos submetidos à vacinação, empregando-se o flagelo como antígeno. Conseqüentemente, o flagelo também teria a capacidade de elevar a virulência da cepa durante o processo infeccioso em camundongos (TAMURA et al., 1995).

O flagelo de *Clostridium chauvoei* teve um papel importante na indução da imunidade em camundongos, mas o antígeno somático foi mais imunogênico que o flagelo. O extrato celular apresentou 100% de proteção, e quando foi diluído em 1:500 pôde ser utilizado sozinho ou misturado em vacinas comerciais (MICALIZZI & GUZMÁN, 1997a).

A suspensão flagelar de *Clostridium chauvoei* estimulou uma resposta sorológica em camundongos demonstrada por títulos de anticorpos no teste de aglutinação, contudo apresentou uma proteção média (75%) quando empregado o teste de desafio com suspensão de esporo contendo $10\text{DL}_{50/\text{camundongo}}$. As suspensões de extrato celular ou cultura celular formolizada apresentaram uma proteção excelente (100%). Tal situação ressaltou importância da imunogenicidade do antígeno somático (MICALIZZI & GUZMÁN, 1997a).

A suspensão de extrato celular foi um bom antígeno com capacidade de desenvolver uma imunidade protetora contra o *Clostridium chauvoei* quando comparada às vacinas comerciais disponíveis na Argentina. Desta forma, a suspensão deveria ser adicionada às vacinas comerciais (MICALIZZI & GUZMÁN, 1997b).

Estudos antigênicos em camundongos demonstraram que proteínas celulares de *Clostridium chauvoei* sonicadas apresentaram uma imunogenicidade superior quando comparada às células formolizadas (MATTAR et al., 2002).

A fase estacionária da cultura de *Clostridium chauvoei* foi a mais adequada para obtenção de imunidade protetora, com a presença de antígenos indutores de maiores títulos de IgG. Dependendo da cepa, a capacidade antigênica diminuiu ou desapareceu nas fases de crescimento ou estacionária tardia. A exposição das células ao pH final baixo, metabólitos de fermentação final ou diminuição da glicose afetou negativamente a imunogenicidade das células bacterianas após 24 horas de incubação, correspondendo à fase de crescimento tardio (MATTAR et al., 2002).

Problemas ocorreram durante o desenvolvimento de um teste de potência de bacterinas contendo *Clostridium chauvoei*. Dentre eles, destacaram-se a diferença entre testes empregando-se cobaias e bovinos, pois o nível de potência das vacinas foi superior quando se utilizaram cobaias nos testes e foi menor quando bovinos foram empregados (CLAUS & MACHEAK, 1972b).

Houve uma relação entre títulos de aglutinação e imunogenicidade em bovinos vacinados empregando-se vacinas experimentais e comerciais contendo bacterinas de *Clostridium chauvoei*. A imunidade protetora foi considerada satisfatória quando se tornou necessário 0,5 µL de soro bovino para realizar a completa aglutinação de 50 µL do antígeno padrão composto por *Clostridium chauvoei* (MACHEAK et al., 1972).

Quando cobaias e bovinos foram submetidos ao teste de potência de vacinas contra o *Clostridium chauvoei*, MACHEAK et al. (1972) verificaram uma proteção igual ou maior em bovinos, comprovando que cobaias foram mais sensível à infecção pelo *Clostridium chauvoei*. Tal situação permitiria o emprego de cobaias nos testes de potência.

O significado das culturas filtradas no desenvolvimento da imunidade deveria ser avaliado no estabelecimento de um teste de potência confiável e aceitável para bacterinas contendo *Clostridium chauvoei* (CLAUS & MACHEAK, 1972a).

Testes de aglutinação não seriam adequados para estimar o nível de anticorpos protetores no soro de animais vacinados e não deveriam ser empregados para o teste de controle de qualidade de vacinas contra carbúnculo sintomático. Bovinos infectados por cepas altamente virulentas de *Clostridium chauvoei* foram efetivamente protegidos somente por vacinas contendo células com antígeno protetor termolábil e antígeno termoestável. Essas cepas altamente virulentas poderiam ser encontradas no campo, sendo necessário assim selecioná-las para o teste de desafio em animais vacinados para o controle de qualidade das vacinas contra carbúnculo sintomático. Dessa forma, um centro internacional deveria ser responsável pela escolha e distribuição dessas cepas (CHANDLER, 1976).

O teste de Elisa como método de avaliação da potência das vacinas contendo antígenos de *Clostridium chauvoei* apresentou duas vantagens: redução significativa do número de cobaias utilizadas e a estimativa de forma quantitativa da potência das vacinas, quando comparado ao teste desafio (CRICHTON et al., 1990).

O teste de Elisa indireto foi desenvolvido com o intuito de quantificar anticorpos específicos para antígeno flagelar altamente purificado de *Clostridium chauvoei* em soro de coelho. O teste compara a densidade óptica de um soro desconhecido a um soro padrão de várias diluições, utilizando linhas paralelas para computar a potência relativa. O soro proveniente de coelhos vacinados contra *C. tetani*, *C. sordelli*, *C. perfringens* tipo C e D, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi* foi avaliado no teste e demonstrou uma reação cruzada mínima. A potência relativa foi resultado de testes sorológicos empregando-se vacinas de diversas potências, e as comparando favoravelmente aos resultados do teste de desafio das cobaias (HAUER et al., 1996).

Nos Estados Unidos, a vacinação contra *Clostridium chauvoei* tem sido praticada por mais de 60 anos. Durante várias décadas, a vacinação contra *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* (Edema Maligno) tem sido considerada a operação mínima requerida para bovinos (ROGERS & SWECKER, 1997).

Um estudo sobre a prática da vacinação em bovinos realizado pelo “National Animal Health Monitoring System” (NAHMS) nos Estados Unidos indicou que mais de 60% dos produtores vacinaram seus animais. Dados relatados pelo NAHMS, em 1994, indicaram que 34,4% dos confinamentos de até 1.000 animais e 91% dos confinamentos com mais de 1.000 animais vacinaram contra um ou mais agentes clostridiais. Esses dados indicaram que a administração de vacinas clostridiais foi uma rotina, sendo o principal componente de um programa básico de saúde animal (ROGERS & SWECKER, 1997).

No Brasil, segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são comercializadas aproximadamente 100 milhões de doses de vacinas por ano (BRASIL, 2003). Entretanto, segundo dados atuais fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), são comercializadas anualmente cerca de 150 milhões de doses de vacinas apresentadas nas formulações monovalentes ou polivalentes. Essa medida preventiva adotada pelos sistemas de produção animal voltados à criação de ovinos e bovinos de corte e leite é de extrema importância e reconhecida pelos produtores, mesmo sendo de aplicação voluntária.

A vacinação contra doenças clostridiais foi responsável por uma significativa redução na taxa de mortalidade dos animais e conseqüentemente aumento no lucro dos produtores (KNOTT et al., 1985).

A aplicação da vacina por via subcutânea diminuiu as lesões musculares no local de aplicação, minimizando os danos teciduais causados pela reação inflamatória local proveniente do adjuvante contido na vacina e conseqüentemente as perdas econômicas dos produtores na comercialização dos bovinos destinados ao abate. Para reduzir a reação inflamatória local recomenda-se a substituição dos adjuvantes oleosos pelo hidróxido de alumínio no processo de fabricação das vacinas (McFARLANE et al., 1996).

O desenvolvimento de lesões no local de aplicação da vacina contra clostridioses aumentou a resposta imunológica dos animais, expressada pelo título de anticorpos nos testes sorológicos (TROXEL et al., 2001).

Os bovinos devem ser imunizados entre 3 e 6 meses de idade, sendo realizadas duas inoculações em um intervalo de 28 dias. Posteriormente, a vacinação deve ser anual até o animal completar 3 anos de idade. A partir dessa idade, adquire proteção natural por repetidos contatos com a bactéria (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

Em locais de alta prevalência da enfermidade o intervalo de vacinação deve ser a cada 9 meses e durante surtos de carbúnculo, a imunização deve ser realizada com agulhas individuais e estéreis, com o intuito de evitar a transmissão da bactéria (ERASMUS et al., 1990).

A imunidade passiva colostrar de bezerros nascidos de mães imunes durou aproximadamente 3 meses, podendo interferir com a imunização ativa (SCHIPPER et al., 1978).

Os títulos de anticorpos aglutinantes para clostridioses em bezerros entre os dias 50 e 53 após o nascimento poderiam ser incrementados se as mães forem vacinadas aproximadamente 4 meses antes da parição. Dessa forma, recomendou-se a vacinação dos bezerros com 60 dias de idade e reforço vacinal com 90 dias, antecedendo a desmama (TROXEL et al., 1997).

Não houve diferença significativa até 4 meses de idade entre os títulos de bezerros vacinados no terceiro dia de idade com uma vacina comercial polivalente contra clostridioses e de bezerros não vacinados, filhos de vacas vacinadas com a mesma vacina próximo ao parto. Dessa forma, a importância e a duração da imunidade passiva foram ressaltadas (TROXEL et al., 2001).

As vacinas comerciais foram avaliadas em diversas combinações de antígenos clostridiais (BROWN et al., 1976; CAMERON et al., 1986; KNOTT et al., 1985; STERNE et al., 1962). Esses imunógenos tiveram em sua composição um ou mais antígenos, dentre eles: *C. chauvoei*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. perfrings* tipo C e D. Um bom grau de imunidade foi obtido após simples injeção de vacinas polivalentes, entretanto foi necessário um reforço para elevar o tempo de imunidade (STERNE et al., 1962).

Uma vacina comercial polivalente composta por bacterina-toxóide de *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. novyi* protegeu 100% das cobaias quando

desafiadas com esporos virulentos. Quando bovinos e ovinos foram submetidos ao teste de desafio, empregando-se o mesmo antígeno na diluição de 1:15, houve uma proteção de 100% contra *C. chauvoei*, *C. septicum* e *C. sordellii*, e também uma proteção de 50% contra *C. novyi* (BROWN et al., 1976).

Cobaias e bovinos imunizados com uma dose reduzida de vacina contendo *Clostridium chauvoei* e produzida em meio semi-sintético, obtiveram excelentes resultados. Duas injeções de 2mL protegeram os bovinos contra o desafio com duas doses letais mínimas de uma cultura virulenta, após mais de 12 meses de vacinação (CAMERON et al., 1986).

Houve uma diferença significativa entre as vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses e as suas respectivas respostas sorológicas em ovinos e caprinos. A reação inflamatória local foi semelhante tanto em ovinos quanto em caprinos e a resposta sorológica foi maior nos ovinos, caracterizando uma melhor imunidade protetora quando comparada aos caprinos (GREEN et al., 1987).

Países desenvolvidos estão interessados na produção de vacinas combinadas em medicina veterinária, devido à redução dos custos durante os processos de fabricação e ao aumento na eficiência dos programas profiláticos a campo. Essas vacinas baseiam-se na compatibilidade biológica dos imunógenos e a interação de vários componentes quando misturados ou liofilizados. No entanto, alguns cuidados devem ser rigorosamente verificados e deve haver transparência dos laboratórios na fabricação das vacinas, pois as mesmas devem conter todos os antígenos que propõem e em quantidades suficientes para conferir boa imunidade aos animais (PROVOST & PERREAU, 1978).

Vacinas contendo células com antígenos protetores termolábeis e termoestáveis comuns a todas as células de *Clostridium chauvoei*, protegeram efetivamente contra algumas cepas altamente virulentas (CHANDLER, 1976).

A vacinação utilizando cepas vacinais homólogas às cepas do meio ambiente induziu uma proteção maior nos animais (SCHIPPER et al., 1978).

Determinadas cepas isoladas de *Clostridium chauvoei* podem diferir em suas habilidades para conferir proteção em cobaias, camundongos e ovelhas, assim como

para conferir imunidade contra outras cepas (KERRY, 1967). Estudos da imunidade protetora demonstraram diferenças entre cepas em suas habilidades para proteger contra um desafio heterólogo padrão (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1970).

KERRY (1967), empregando um desafio de letalidade conhecida, constatou que as diferenças na virulência das cepas são desprezíveis e que a vacinação com cepas individuais tem um melhor resultado de proteção contra desafio homólogo em comparação ao desafio heterólogo, pois algumas cepas produzem vacinas que tem um espectro de proteção maior que outras.

Os antígenos produzidos por algumas cepas de *Clostridium chauvoei* poderiam ser modificados ou até mesmo ser perdidos depois de repetidas subculturas em laboratório. Devido a isso, uma cepa recém-isolada demonstraria ter uma capacidade altamente virulenta (KERRY, 1967).

A importância prática de um espectro protetor distinto entre cepas poderia não ser significativa se um animal fosse desafiado enquanto solidamente imune. Entretanto, torna-se relevante quando a imunidade estivesse diminuída ou em fase de desenvolvimento, especialmente se estimulada por uma vacina composta por uma cepa simples. Para estimular uma imunidade protetora nos animais que vivem sob condições de campo, torna-se importante a inclusão de cepas de campo na composição da vacina. Um soro hiperimune, produzido particularmente por uma mistura de cepas antigênicas, deveria em função do número de injeções necessárias para hiperimunizar o animal doador, conter uma quantidade suficiente de anticorpos inespecíficos de *Clostridium chauvoei* com o intuito de proteger o animal receptor contra um desafio frente a cepas de campo (KERRY, 1967).

As variações entre cepas devem ser avaliadas quando a potência das vacinas é testada, pois quando comparações são feitas entre vacinas, resultados equivocados podem ser obtidos se o desafio é realizado com uma cepa simples. A vacina homóloga parecerá mais imunogênica. Para trabalhos comparativos e para testes corretos de vacinas individuais é melhor o uso de uma mistura de cepas, ou várias cepas individuais diferentes, em seqüência para obter um resultado significativo (KERRY, 1967).

A ocorrência de mortes de bovinos por carbúnculo sintomático na Austrália, entre abril de 1976 e abril de 1977, conduz questionamentos quanto à eficácia das vacinas clostridiais. Para tal fato foram consideradas três possibilidades: vacina com potência reduzida, desafio anormal e cepa de campo ausente na vacina (REED & REYNOLDS, 1977).

Algumas cepas de campo têm a capacidade de vencer a imunidade dos animais vacinados pela cepa padrão. Essa situação ocorre devido à ausência de conhecimento dos antígenos capazes de induzir uma imunidade protetora. Para reduzir as falhas vacinais, as indústrias têm desenvolvido vacinas clostridiais polivalentes, porém as mesmas têm sido questionadas em função da falta de transparência durante o processo de fabricação das vacinas (WOOLCOCK & FROST, 1977).

Há uma grande carência de um sistema que previna e relate precocemente surtos da enfermidade e de informações referentes a cepas de campo de *Clostridium chauvoei* (DODSON, 1978).

Cobaias vacinadas por diferentes produtos comerciais contra o carbúnculo sintomático e submetidas ao desafio com a cepa de referência (MT) no teste de potência das vacinas, seguindo a metodologia empregada pelo MAPA, apresentaram uma imunidade protetora em 95,46% das vacinas testadas. Por outro lado, quando utilizada a cepa de campo (SP) para o desafio, apenas 36,36% das vacinas foram aprovadas. Nessa condição, grande parte dos imunógenos comercializados no Brasil (63,64%) não protegeu as cobaias no desafio da cepa de campo (SP) (SANTOS, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a resposta sorológica de bovinos vacinados contra o *Clostridium chauvoei* pelos testes de aglutinação em placa e Elisa.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta sorológica de bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridiose em três protocolos distintos de vacinação.
- Avaliar a presença de anticorpos de origem colostrar em bezerros contra o *Clostridium chauvoei* aos 7 (± 2), 45 e 90 dias após o nascimento.
- Avaliar a resposta sorológica contra o *Clostridium chauvoei* em vacas Nelore multíparas com idade superior a 4 anos.
- Comparar os valores de sensibilidade e de especificidade entre os testes de aglutinação em placa e Elisa, empregando-se a análise *Bayesiana*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de Realização do Trabalho

As atividades de campo foram executadas em três experimentos. O experimento referente aos três protocolos distintos de vacinação foi realizado na Agropecuária Estrela do Céu, Fazenda Santa Paula, Município de Lavínia, SP. O experimento da imunidade passiva foi desenvolvido no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios (PRDTA) do Extremo Oeste, Andradina, SP. As vacas multíparas com idade acima de quatro anos cujos anticorpos séricos foram avaliados pertenciam à Fazenda Córrego Azul, localizada em Brasilândia, MS.

As atividades laboratoriais foram executadas no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais e no Laboratório de Virologia Animal, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Unesp, *Campus* de Araçatuba, SP.

4.2 Vacinas Comerciais

As três vacinas comerciais polivalentes distintas, contendo *Clostridium chauvoei*, foram adquiridas em lojas comerciais, com a observação dos prazos de validade e de conservação. Após a aquisição, os produtos foram identificados por uma numeração de 1 a 3.

4.3 Grupos Experimentais

4.3.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses

Foram avaliados 60 bezerros mestiços (Nelore, Aberdeen Angus, Brahman e Red Angus), cujas mães multíparas haviam sido submetidas ao manejo sanitário da propriedade, constando de duas vacinações anuais contra o carbúnculo sintomático (maio e novembro). Os bezerros foram divididos em três grupos (n=15 cada), submetidos aos diferentes esquemas de vacinação, com o emprego de uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses. A vacinação foi realizada por via subcutânea segundo a dose recomendada pelo fabricante. O Grupo 1 foi vacinado aos 4 meses e na desmama (8 meses). O Grupo 2 foi primovacinado na desmama e recebeu reforço 30 dias após. O Grupo 3 recebeu uma única dose da vacina na desmama. Como controle (n=15), foi avaliado sorologicamente bezerros não vacinados e pertencentes ao mesmo lote de animais. As coletas do soro foram realizadas aos 4, 8, 9 e 10 meses após o nascimento, aproximadamente.

4.3.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros

Foram avaliados sorologicamente 36 bezerros recém-nascidos da raça Nelore, cujas mães foram vacinadas contra o carbúnculo sintomático pelo menos 2 meses antes da parição e receberam um reforço 42 dias após, com duas vacinas comerciais polivalentes (V2, n=12 e V3, n=12). Como controle (n=12), foram avaliados sorologicamente bezerros filhos de vacas não vacinadas. As coletas do soro foram realizadas nos dias 7 (± 2), 45 e 90 após o nascimento.

4.3.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos

Foram avaliadas 30 vacas cuja faixa etária era superior a 4 anos, da raça Nelore, sem o histórico de vacinação contra o carbúnculo sintomático havia pelo menos dois anos.

4.4 Coleta e Armazenamento do Soro

As amostras de sangue foram coletadas dos bezerros e das vacas através de punção da veia jugular externa, com auxílio de tubos Vacuntainer[®]. As amostras de sangue foram mantidas a temperatura ambiente até a retração completa do coágulo. Posteriormente, foram centrifugadas para obtenção do soro. Este permaneceu congelado (-20°C) até o momento de sua utilização nos testes sorológicos.

4.5 Soros Controles

Os soros positivos utilizados na padronização dos testes de aglutinação em placa e Elisa foram obtidos de dois bovinos de 18 meses de idade submetidos a três doses de uma vacina comercial polivalente contra clostridiose, sendo o intervalo entre as vacinações de 15 dias.

O soro negativo utilizado na padronização dos testes de aglutinação em placa e Elisa foram obtidos de um bezerro recém-nascido, antes da ingestão do colostro.

4.6 Cepas de *Clostridium chauvoei*

Para os testes de aglutinação em placa e Elisa foram empregadas como antígenos duas cepas distintas de *Clostridium chauvoei*, denominadas MT (cepa oficial) e SP (cepa de campo). A cepa MT de referência foi fornecida pelo MAPA. A cepa SP foi isolada de surto natural, devidamente identificada pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) e mantida na bacterioteca do Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, no Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal, Unesp, *Campus* de Araçatuba.

4.7 Teste de Aglutinação em Placa

4.7.1 Produção do Antígeno de *Clostridium chauvoei*

As cepas de *Clostridium chauvoei* de referência (MT) e de campo (SP) foram cultivadas em meio modificado de cultura (Anexo I) descrito por CLAUS & MACHEAK (1972b).

O meio modificado foi ajustado para um pH 7,2 e autoclavado a 121°C por 15 minutos em tubos de 20 mL e dois balões volumétricos de 500 mL. Logo após, o meio foi resfriado a 37°C e posteriormente identificado e armazenado a 4°C. Para o repique das cepas MT e SP, 1 mL de cada cultura de *Clostridium chauvoei* em atividade crescente foi adicionado aos tubos de 20 mL e incubados por 12 horas a 37°C em jaras de anaerobiose (Oxoid®) juntamente com o Anaerogen®. A verificação do crescimento satisfatório tornou-se possível pelo aspecto turvo e pela formação de bolhas de gás. Esfregaços corados pelo Gram foram realizados para verificar as características morfo-tintoriais e monitorar o crescimento bacteriano.

A inoculação da cultura de *Clostridium chauvoei* das cepas MT e SP em balões volumétricos de 500 mL ocorreu durante o crescimento ótimo, quando 10 mL da cultura do tubo foram semeadas nos mesmos. Os balões volumétricos foram colocados em

jarras de anaerobiose (Oxoid®) contendo Anaerogen®, em conjunto com alguns tubos de 20 mL para observação dos respectivos crescimentos. Foram incubados a 37°C por 48 horas, quando observadas a formação de bolhas e a turvação do meio.

Formalina foi adicionada na concentração de 1% do volume final e levemente misturada pelo agitador magnético. A cultura formolizada foi incubada por 18 horas a 37°C. Depois, a cultura foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5810R®) a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. As células precipitadas (pellet) foram ressuspensas em solução salina tamponada (Anexo II) contendo 0,1% de formalina.

O antígeno foi mantido a 4°C em tubo cônico de plástico e padronizado na concentração de 4×10^8 bactérias/ml empregando-se o teste de turbidez segundo a escala de Mac Farland (BIER, 1980).

4.7.2 Procedimento do Teste

O teste de aglutinação foi conduzido em placa e caixa de Huddleson, segundo a metodologia de CLAUS & MACHEAK (1972b). Foram adicionados 40 µL do antígeno de cada cepa as quantidades de 40 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL e suas respectivas diluições 1:10 e 1:100 dos soros bovinos a serem avaliados (Tabelas 1 e 2). Os soros foram diluídos em solução fisiológica (0,85% NaCl). A mistura foi realizada manualmente, com auxílio de espátulas descartáveis, seguida de 15 movimentos circulares. Posteriormente, a placa permaneceu na caixa escura de Huddleson por 10 minutos. Depois, foram realizados mais 30 movimentos circulares com a placa. A leitura das reações foi efetuada com iluminação indireta da caixa de Huddleson, onde a mistura antígeno-soro pode ser examinada macroscopicamente, seguindo o mesmo procedimento de leitura do teste de brucelose.

Tabela 1. Quantidade da mistura antígeno-soro para o teste de aglutinação em placa.

Antígeno	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L
	+	+	+	+
Soro	40 μ L	20 μ L	10 μ L	5 μ L

Tabela 2. Procedimento de diluição do soro para o teste de aglutinação em placa.

Diluição do soro	Volume (μ L) de soro			
Não Diluído	40	20	10	5
1/10	4	2	1	0,5
1/100	0,4	0,2	0,1	0,05

Quando um soro de alto título é testado, a aglutinação deve ocorrer ao redor da periferia da mistura antígeno-soro. Em soro de baixo título, a aglutinação deve produzir grânulos vistos inteiramente na mistura.

As reações foram consideradas positivas quando houve uma aglutinação periférica e central da mistura antígeno-soro. A aglutinação apenas central da mistura foi considerada como reação negativa, sendo atribuída à reação de auto-aglutinação desenvolvida pela bactéria. As interpretações dos títulos dos soros bovinos individuais seguiram o mesmo protocolo de diluição da brucelose (Tabela 3).

Tabela 3. Interpretação do título para o teste de aglutinação em placa.

Diluição / Volume de Soro	40 μ L	20 μ L	10 μ L	5 μ L
Não Diluído	25	50	100	200
1/10	250	500	1.000	2.000
1/100	2.500	5.000	10.000	20.000

4.8 Teste de Elisa

4.8.1 Produção do Antígeno de *Clostridium chauvoei*

As cepas de *Clostridium chauvoei* de referência (MT) e de campo (SP) foram cultivadas em Meio Reforçado de Clostrídio (Oxoid®) conforme recomendado por CRICHTON et al. (1990).

As culturas foram incubadas em balões volumétricos de 500 mL por 24 horas a 37°C em jarras de anaerobiose (Oxoid®) contendo Anaerogen®. As células bacterianas foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810R®) a 3.000 RPM durante 20 minutos a 4°C. As células precipitadas (pellet) retornaram em 50% ao seu volume original em meio tampão DPBS (Anexo III), e depois foram centrifugadas novamente. Após duas lavagens, as células foram suspensas em 25 mL de solução tamponada de fosfato de sódio (Anexo III).

A suspensão celular foi sonicada por 10 minutos em tubo cônico de plástico contendo um volume de 10 a 15 mL. Depois, a suspensão celular foi misturada e mantida congelada em tubos de criopreservação (Nunc®) de 1 mL a -70°C. Os antígenos tiveram suas concentrações protéicas dosadas pelo método calorimétrico do ácido bicinconínico (BCA), atingindo as seguintes concentrações: 2,72 mg/mL para a cepa MT e 2,50 mg/mL para a cepa SP.

4.8.2 Procedimento do Teste

Os antígenos e os soros controles positivos e negativos sofreram uma série de diluições, enquanto o conjugado foi mantido na diluição de 1:10.000.

Os antígenos MT e SP foram submetidos às diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1.600 em duplicata utilizando placas individuais para cada antígeno.

Os soros controles, positivo e negativo, foram diluídos a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400, 1:12.800, 1:25.600, 1:51.200 e 1:102.400 em

quadruplicata nas placas, exceto as diluições 1:51.200 e 1:102.400 do soro controle negativo, que foram em duplicata. Quatro orifícios da placa foram utilizados como controle da mesma (branco).

Verificou-se nas diluições 1:50 dos antígenos MT e SP e 1:100 dos soros controles positivo e negativo uma diferença acentuada dos valores de absorbância entre bovinos que apresentam uma resposta sorológica considerada satisfatória para a presença de anticorpos contra o *Clostridium chauvoei* de bovinos sem a ingestão de colostro, ou seja, ausência total de anticorpos.

Placas de microtitulação de 96 orifícios (Nunc[®]) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) (Anexo IV) cuja diluição foi 1:50, em câmara úmida por 12 horas a 4°C. Depois, as placas foram submetidas a um ciclo de três lavagens com PBS Tween 0,05% (PBS-T) (Anexo IV) em uma lavadora automática de placas.

O bloqueio foi realizado com 200 µL de leite em pó desnatado (LPD - Molico[®]) 10% diluído em TCB por orifício. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos, e em seguida foram realizadas as lavagens conforme descrito anteriormente.

Na seqüência, foram adicionados 100 µL dos soros testes e controles diluídos em PBS (Anexo IV) + 10% LPD, cuja diluição foi 1:100. Dois orifícios da placa não receberam soro, somente o tampão, e foram utilizados como o controle da placa (branco). As placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Nova seqüência de lavagens com PBS-T foi realizada.

Posteriormente, cada orifício da placa recebeu 100 µL de conjugado imunoenzimático comercial (SIGMA[®]), correspondente a soro de coelho anti Ig G bovina conjugado com peroxidase na diluição de 1:10.000 em PBS + 10% LPD, sendo as placas incubadas novamente a 37°C por 90 minutos. Mais uma seqüência de lavagem com PBS-T foi realizada.

A seguir, foram adicionados 50 µL por orifício da solução de substrato orto-fenileno-diamina (OPD), diluída em tampão citrato-fosfato (Anexo IV). A reação foi interrompida após 15 minutos com solução de HCl 2 M (50 µL/orifício). A leitura foi

realizada em um espectrofotômetro (LabSystem - Multiskan EX[®]) para microplacas, em filtro de 492 nm.

4.9 Análise Estatística

4.9.1 Análise Estatística Convencional

Os dados dos testes de aglutinação em placa e Elisa foram transformados em $\log(x+1)$ e submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. Entretanto, os dados do primeiro teste foram apresentados em médias geométricas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

O mesmo teste foi empregado para analisar a imunidade passiva em bezerros até os três meses de idade, além de análise de correlação e regressão dos valores de anticorpos maternos (títulos do teste de aglutinação em placa e densidade óptica) contra as cepas de referência (MT) e de campo (SP) de *Clostridium chauvoei*, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System - 1999).

4.9.2 Análise Estatística *Bayesiana*

A análise *Bayesiana* consiste na obtenção de medidas, resumos ou densidades a “posteriori” para os parâmetros de interesse nos modelos em estudo. Estas medidas ou densidades são obtidas combinando as informações a “priori” sobre os parâmetros de interesse e informações contidas nos dados da amostra. No entanto, nem sempre a função de verossimilhança e as distribuições a “priori” são analiticamente tratáveis. No

presente estudo, os valores analisados foram selecionados a “priori” e definidos como: animais (n=15) com vacinação aos 4 meses e reforço aos 8 meses pertencentes ao grupo 1 (G1) do experimento 1 (resposta sorológica em bezerros induzidos com vacina comercial polivalente contra clostridioses); como antígeno empregou-se o resultado da cepa de referência (MT). Nesse sentido, foram comparadas em modelos individuais as técnicas sorológicas calculando a sensibilidade (se), a especificidade (sp) e a prevalência de anticorpos, com intuito de observar qual a metodologia sorológica se aplica à determinação do melhor momento para a revacinação. Os dados foram tratados utilizando o software gratuito da Universidade de Davis, Califórnia, USA (<http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/>). Os valores modais foram transformados pelo sistema de beta distribuição com o programa computacional BETABUSTER 1.0 free software. Para a condicional independente, o modelo *Bayesiano* gerado foi 1 população, 2 testes e a ausência de um “gold test” ou teste padrão. A sensibilidade e a especificidade de cada teste, o módulo, a prevalência e os valores de beta (α, β) foram submetidos à análise de inferência *Bayesiana* ilustrada a seguir:

TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM PLACA

```
model
{
  Tpos ~ dbin(p, n)
  p <- pi*Se + (1-pi)*(1-Sp)
  Z ~ dbern(tau0)
  Se ~ dbeta(88.28,1.89) ## Mode=0.99, 95% sure Se > 0.95
  Sp ~ dbeta(20.63, 1.19) ## Mode=0.99, 95% sure Sp > 0.85
  pistar ~ dbeta(130.70, 15.41 ) ## Mode=0.9, 95% sure pistar > 0.85
  pi <- Z*pistar
  piequal0 <- equals(pi,0)
}
list(n=15, Tpos=15, tau0=0.95)
list(pistar=0.9, Se=0.99, Sp=0.99, Z=0)
```

TESTE DE ELISA INDIRETO

```

model
{
  Tpos ~ dbin(p, n)
  p <- pi*Se + (1-pi)*(1-Sp)
  Z ~ dbern(tau0)
  Se ~ dbeta(88.27, 1.88) ## Mode=0.99, 95% sure Se > 0.95
  Sp ~ dbeta(12.92, 1.12) ## Mode=0.99, 95% sure Sp > 0.78
  pistar ~ dbeta(130.70, 15.41) ## Mode=0.9, 95% sure pistar > 0.85
  pi <- Z*pistar
  piequal0 <- equals(pi,0)
}
list(n=15, Tpos=15, tau0=0.95)
list(pistar=0.9, Se=0.99, Sp=0.99, Z=0)

```

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Aglutinação em Placa

5.1.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses

Nos três esquemas de vacinação avaliados houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos títulos médios de anticorpos aglutinantes séricos após a vacinação ou reforço. Os bezerros primovacinados aos 4 meses de idade (G1) apresentaram títulos de anticorpos aglutinantes quando avaliados aos 8 meses e não diferiram dos outros dois esquemas de vacinação (G2 e G3) quando avaliados aos 10 meses de idade. Os títulos de anticorpos aglutinantes dos primovacinados aos 8 meses de idade e reforço vacinal 30 dias após (G2) não diferiram dos outros dois esquemas (G1 e G3). Os bezerros primovacinados na desmama (G3) apresentaram um aumento significativo nos títulos médios de anticorpos quando avaliados 30 dias após, no entanto aos 10 meses não diferiram dos outros grupos avaliados. Quando a aglutinação foi realizada com a cepa de campo (SP), os títulos de anticorpos foram significativamente inferiores aos 4 meses e aos 9 meses de idade na avaliação do G3 (Tabela 4).

Tabela 4. Média geométrica dos títulos da resposta sorológica contra o *Clostridium chauvoei* de bezerros induzidos com uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses, avaliados pelo teste de aglutinação em placa.

Cepa	Grupo	Meses			
		4	8	9	10
MT	G1	120,30 aC	757,85 aB	1.906,66 aA	1.447,26 aA
	G2	138,19 aB	109,68 bB	1.823,44 aA	1.741,10 aA
	G3	151,57 aB*	95,48 bC	1.096,82 bA*	1.319,50 aA
	Controle	65,97 bB	52,36 cBC	47,74 cC	182,34 bA
SP	G1	120,30 aC	793,70 aB	1.561,49 aA	1.259,92 aA
	G2	114,87 aB	100,00 bB	1.587,40 aA	1.662,47 aA
	G3	114,87 aC	95,48 bC	793,70 bB	1.319,50 aA
	Controle	65,97 bB	52,36 cBC	50,00 cC	182,34 bA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* Diferença significativa em relação à cepa SP ($P < 0,05$).

G1 = vacinados aos 4 e 8 meses; G2 = vacinados aos 8 e 9 meses; G3 = vacinados 8 meses; Controle = não vacinados.

5.1.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) dos títulos de anticorpos passivos dos bezerros, quando avaliados aos 45 e 90 dias após o nascimento. Não houve diferença entre as duas vacinas polivalentes avaliadas. A resposta sorológica passiva dos animais foi significativamente inferior ($p < 0,05$) quando o antígeno empregado no teste de aglutinação em placa foi elaborado com a cepa de campo (SP) (Tabela 5).

Na análise dos títulos obtidos pelos grupos aos 7 dias de vida, não foi verificada uma correlação linear entre os dias de vacinação das mães antes do parto e o nascimento dos bezerros. À medida que transcorreu mais tempo da vacinação das mães até o parto, não foi detectada uma redução do título de anticorpos maternos nos

bezerros (Tabela 6). A representação gráfica da correlação linear entre o dia da vacinação das mães e o dia do parto está registrada nas Figuras 1 e 2.

Tabela 5. Média geométrica dos títulos da resposta sorológica passiva contra o *Clostridium chauvoei* de bezerros cujas mães foram induzidas com duas vacinas comerciais polivalentes (V2 e V3) contra clostridioses, avaliados pelo teste de aglutinação em placa.

Cepa	Grupo	Idade (dias aproximados)		
		7	45	90
MT	V2	4.372,59 aA*	219,49 aB*	59,50 aC
	V3	2.562,13 bA	203,38 aB	59,52 aC
	Controle	59,54 cA	39,74 bB	0 bC
SP	V2	3.041,03 aA	203,75 aB	47,21 aC
	V3	1.811,97 aA	188,79 aB	56,26 aC
	Controle	63,09 bA	39,74 bB	0 bC

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* Diferença significativa em relação à cepa SP ($P < 0,05$).

Tabela 6. Coeficiente de correlação linear entre os dias de vacinação das mães e de nascimento dos bezerros para o teste de aglutinação em placa e as cepas de referência (MT) e de campo (SP).

Cepa	Coeficiente de correlação (R)
Referência (MT)	- 0,295
Campo (SP)	-0,327

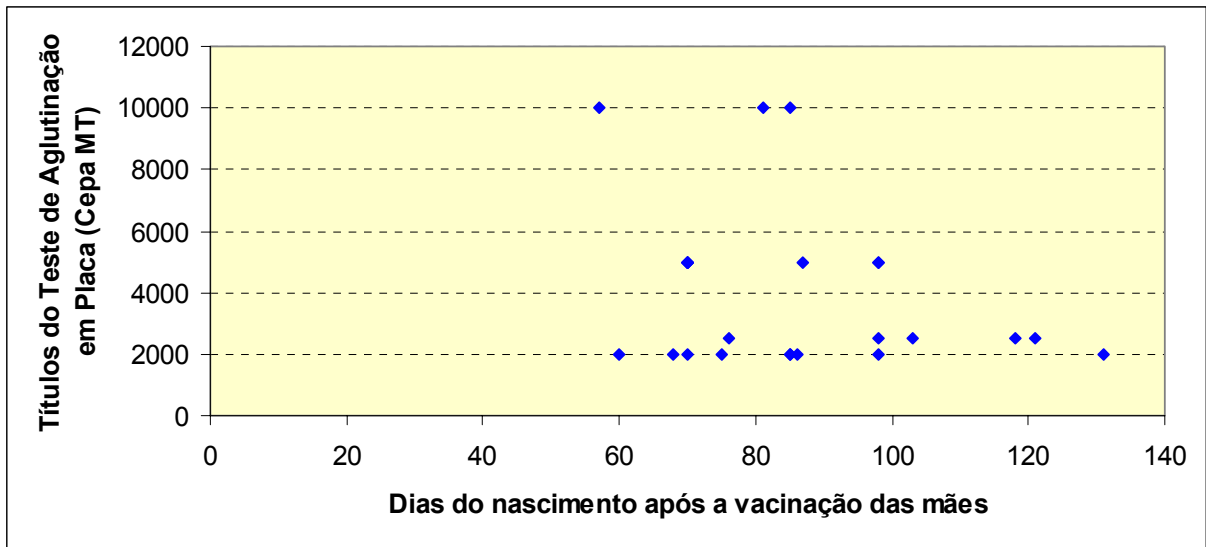


Figura 1. Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos passivos maternos avaliados pelo teste de aglutinação em placa para a cepa de referência (MT) de *Clostridium chauvoei*, em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.

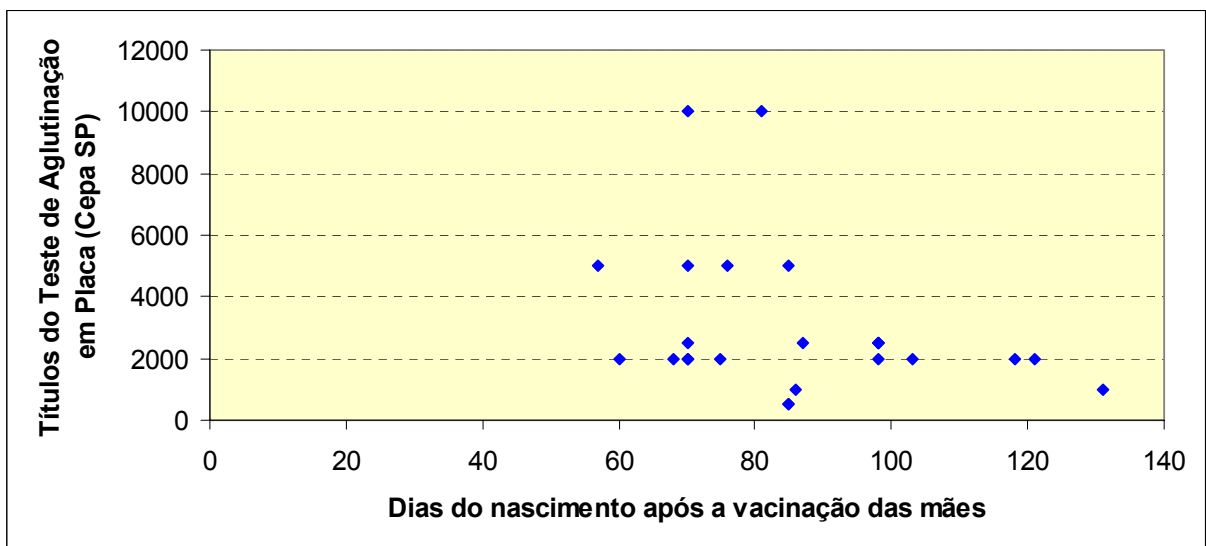


Figura 2. Diagrama de dispersão dos títulos de anticorpos passivos maternos avaliados pelo teste de aglutinação em placa para a cepa de campo (SP) de *Clostridium chauvoei*, em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.

5.1.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos

As 30 vacas avaliadas sorologicamente apresentaram títulos de anticorpos aglutinantes séricos. Esses títulos oscilaram de valores entre 200 e 500 para ambas as cepas. Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) dos títulos quando o antígeno empregado no teste de aglutinação em placa foi elaborado com a cepa de campo (SP). A cepa de referência (MT) apresentou uma média geométrica do título de 236,11 enquanto a cepa de campo (SP) obteve 215,61.

5.2 Teste de Elisa

5.2.1 Experimento 1: Resposta sorológica em bezerros induzida por vacina comercial polivalente contra clostridioses

Nos três esquemas de vacinação avaliados houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores médios de anticorpos séricos após a vacinação ou o reforço (Tabela 7 e Figuras 3 e 4).

Os bezerros do G1, primovacinados aos 4 meses, apresentaram uma redução dos títulos de anticorpos quando avaliados aos 8 meses. Após o reforço aos 8 meses de idade houve um aumento significativo dos valores, gerando uma diferença em relação aos outros dois esquemas de vacinação (G2 e G3) aos 9 meses, mas não diferiu do G2 quando avaliado aos 10 meses de idade. Os valores de anticorpos dos primovacinados aos 8 meses de idade e reforço vacinal 30 dias após (G2) não diferiram do G3 aos 9 meses (Tabela 7 e Figuras 3 e 4).

Os bezerros primovacinados na desmama (G3) apresentaram um aumento significativo dos valores de anticorpos quando avaliados 30 dias após, no entanto aos 10 meses diferiram dos outros grupos avaliados (G1 e G2), mas não do controle. Quando o teste de Elisa foi realizado com a cepa de campo (SP), os valores de

anticorpos foram significativamente inferiores em dois momentos da avaliação no G1, um no G3 e três no Controle. Quando se empregou a cepa de referência (MT), os valores foram significativamente inferiores em um momento da avaliação no G1 e outro no G2 (Tabela 7 e Figuras 3 e 4).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra o *Clostridium chauvoei* de bezerros induzidos com uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses, avaliados pelo teste de Elisa.

Cepa	Grupo	Meses			
		4	8	9	10
MT	G1	0,424 ± 0,227 aB	0,256 ± 0,133 abB*	1,045 ± 0,336 aA*	0,830 ± 0,275 aA*
	G2	0,289 ± 0,161 abC	0,101 ± 0,060 bD*	0,504 ± 0,183 bB	0,986 ± 0,310 aA
	G3	0,299 ± 0,156 abAB	0,240 ± 0,193 abB*	0,447 ± 0,231 bA	0,325 ± 0,169 bAB
	Controle	0,178 ± 0,082 bB	0,386 ± 0,325 aA*	0,203 ± 0,132 cB*	0,266 ± 0,125 bAB*
SP	G1	0,401 ± 0,237 aB	0,356 ± 0,146 aB	0,865 ± 0,307 aA	0,772 ± 0,254 aA
	G2	0,282 ± 0,141 abC	0,140 ± 0,088 bC	0,497 ± 0,193 bB	0,970 ± 0,296 aA
	G3	0,314 ± 0,141 abA	0,171 ± 0,141 bB	0,427 ± 0,210 bA	0,318 ± 0,126 bA
	Controle	0,192 ± 0,068 bA	0,230 ± 0,185 abA	0,179 ± 0,139 cA	0,231 ± 0,112 bA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* Diferença significativa em relação à cepa SP ($P < 0,05$).

G1 = vacinados aos 4 e 8 meses; G2 = vacinados aos 8 e 9 meses; G3 = vacinados 8 meses; Controle = não vacinados.

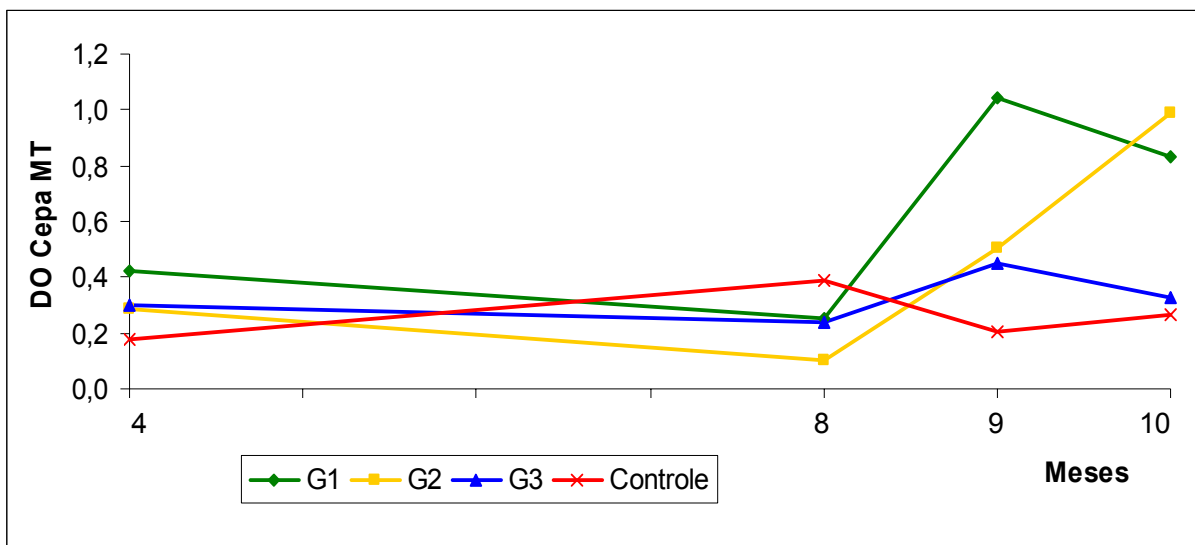


Figura 3. Resposta sorológica (DO) para a cepa de referência (MT) de *Clostridium chauvoei* em bovinos, induzida por uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses em três protocolos distintos de vacinação (G1, G2 e G3), e avaliados pelo teste de Elisa em diferentes momentos.

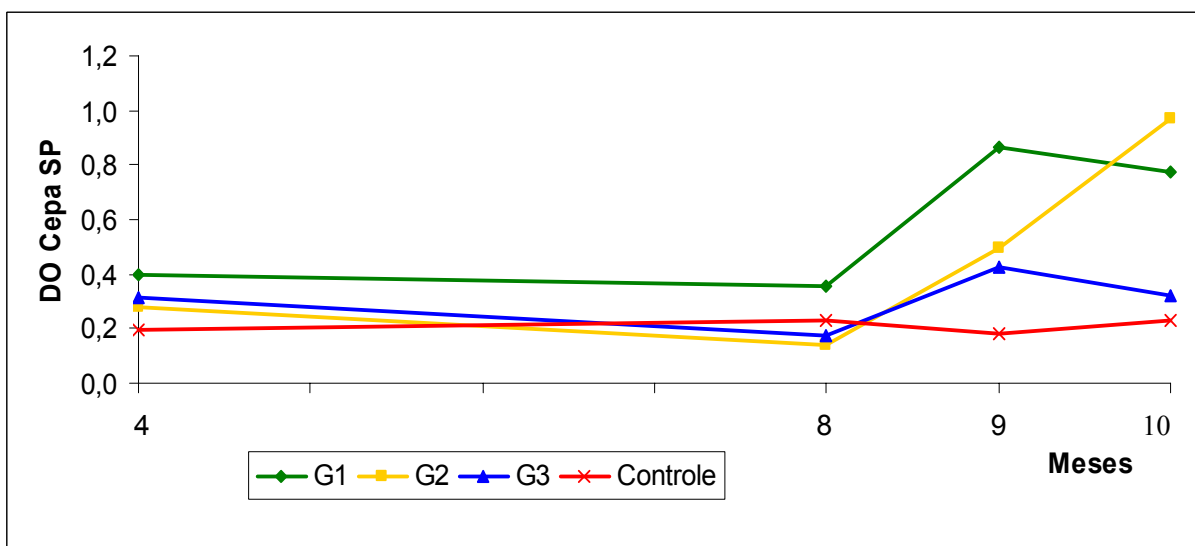


Figura 4. Resposta sorológica (DO) para a cepa de campo (SP) de *Clostridium chauvoei* em bovinos induzida por uma vacina comercial polivalente (V1) contra clostridioses em três protocolos distintos de vacinação (G1, G2 e G3), e avaliados pelo teste de Elisa em diferentes momentos.

5.2.2 Experimento 2: Anticorpos de origem colostrar em bezerros

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de anticorpos passivos dos bezerros, quando avaliados aos 45 e 90 dias após o nascimento. Não houve diferença entre as duas vacinas polivalentes avaliadas. A resposta sorológica passiva do grupo controle apresentou-se significativamente inferior ($p < 0,05$) quando o antígeno empregado no teste de Elisa foi elaborado com a cepa de campo (SP) (Tabela 8 e Figuras 5 e 6).

Na análise dos valores obtidos pelos grupos aos 7 dias de vida, foi verificada uma correlação linear entre os dias de vacinação das mães antes do parto e o nascimento dos bezerros. À medida que transcorreu mais tempo da vacinação das mães até o parto, menores foram os valores de anticorpos de origem materna detectados nos bezerros (Tabela 9). A representação gráfica da correlação linear entre o dia da vacinação das mães e a época do parto está registrada nas Figuras 7 e 8.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica passiva (DO) contra o *Clostridium chauvoei* de bezerros cujas mães foram induzidas com duas vacinas comerciais polivalentes (V2 e V3) contra clostridioses, avaliados pelo teste de Elisa.

Cepa	Grupo	Dias		
		7	45	90
MT	V2	1,098 \pm 0,188 aA	0,603 \pm 0,150 aB	0,305 \pm 0,122 aC
	V3	1,164 \pm 0,106 aA	0,551 \pm 0,171 aB	0,355 \pm 0,160 aC
	Controle	0,651 \pm 0,237 bA	0,348 \pm 0,162 bB*	0,124 \pm 0,085 bC
SP	V2	1,117 \pm 0,193 aA	0,607 \pm 0,162 aB	0,311 \pm 0,134 aC
	V3	1,147 \pm 0,078 aA	0,553 \pm 0,177 aB	0,359 \pm 0,164 aC
	Controle	0,633 \pm 0,231 bA	0,332 \pm 0,161 bB	0,121 \pm 0,086 bC

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* Diferença significativa em relação à cepa SP ($P < 0,05$).

V2 = Vacina polivalente 2; V3 = Vacina polivalente 3; Controle = não vacinados.

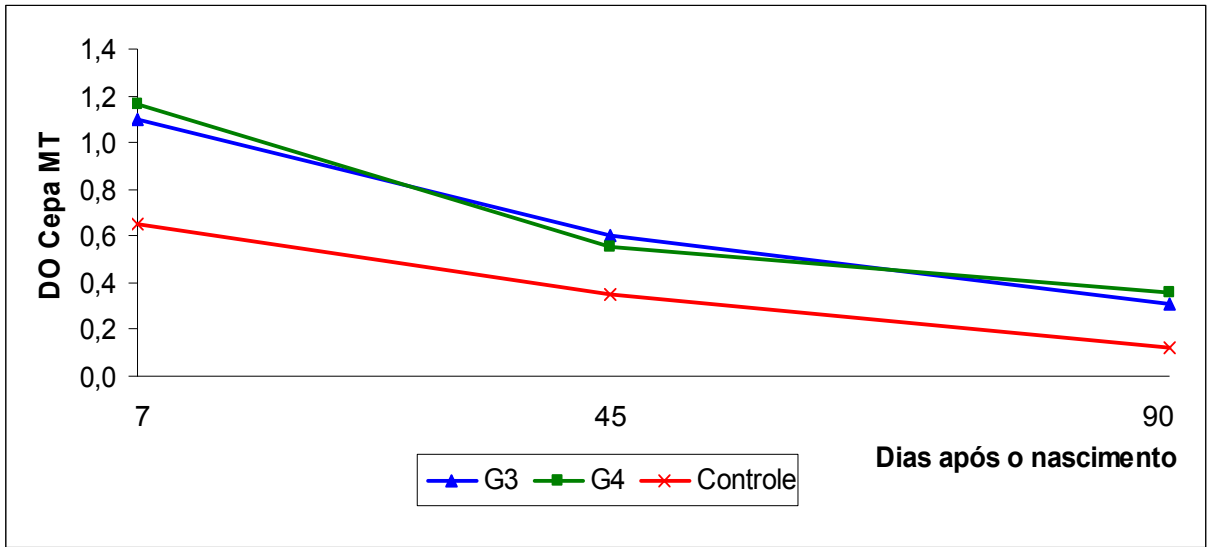


Figura 5. Imunidade natural passiva para a cepa de referência (MT) de *Clostridium chauvoei* em bezerros até 90 dias de idade, avaliada pelo teste de Elisa.

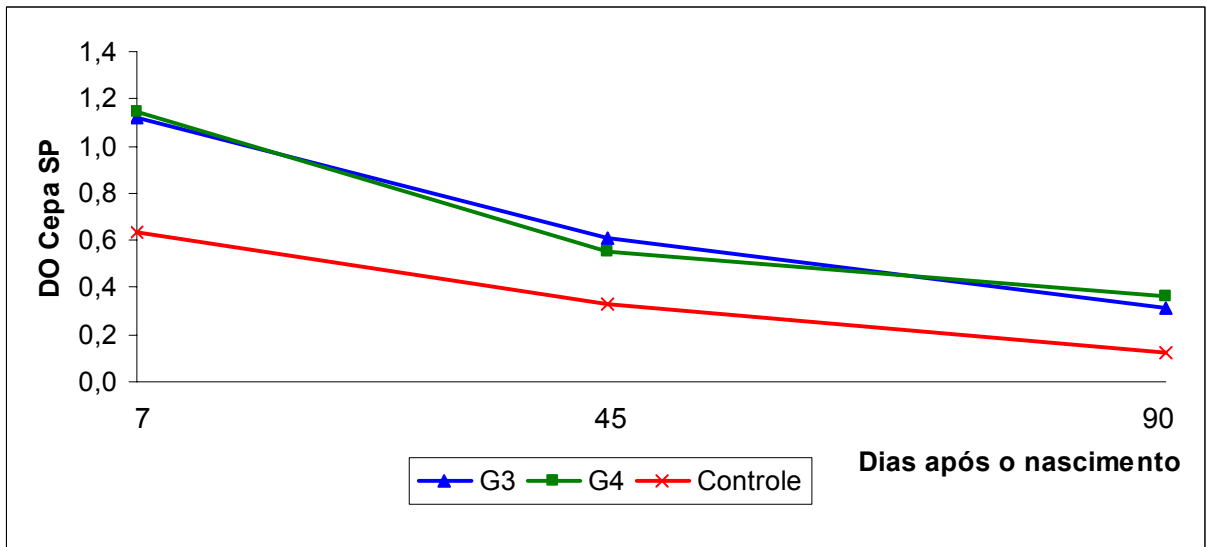


Figura 6. Imunidade natural passiva para a cepa de campo (SP) de *Clostridium chauvoei* em bezerros até 90 dias de idade, avaliada pelo teste de Elisa.

Tabela 9. Coeficiente de correlação linear entre os dias de vacinação das mães e de nascimento dos bezerros para o teste de Elisa e as cepas de referência (MT) e de campo (SP).

Cepa	Coeficiente de Correlação (R)
Referência (MT)	-0,528*
Campo (SP)	-0,497*

* Diferença significativa ($P < 0,05$).

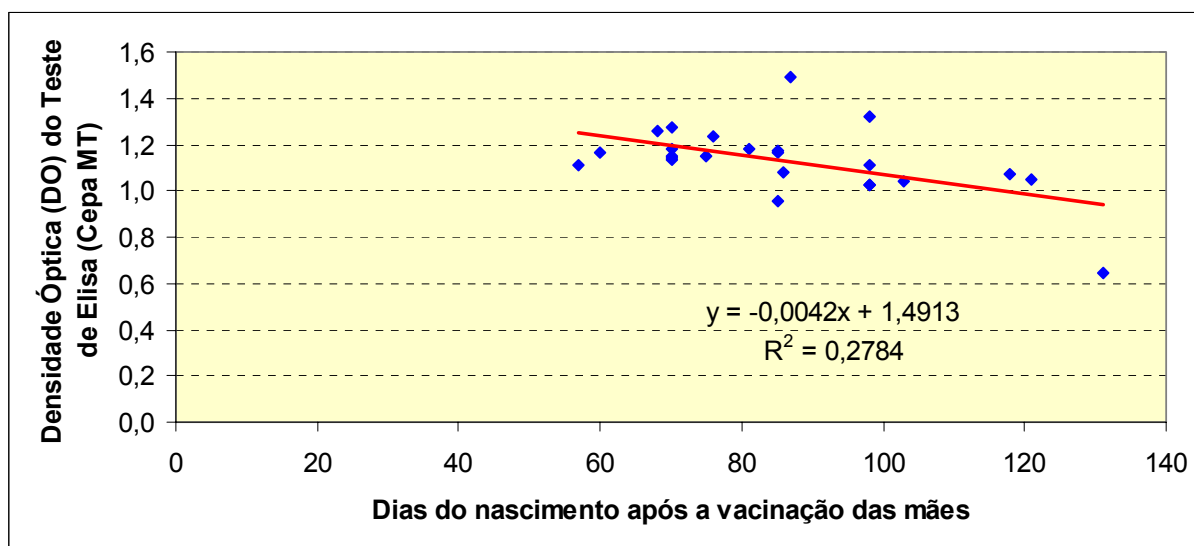


Figura 7. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) pelo teste de Elisa para a cepa de referência (MT) de *Clostridium chauvoei*, em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R^2).

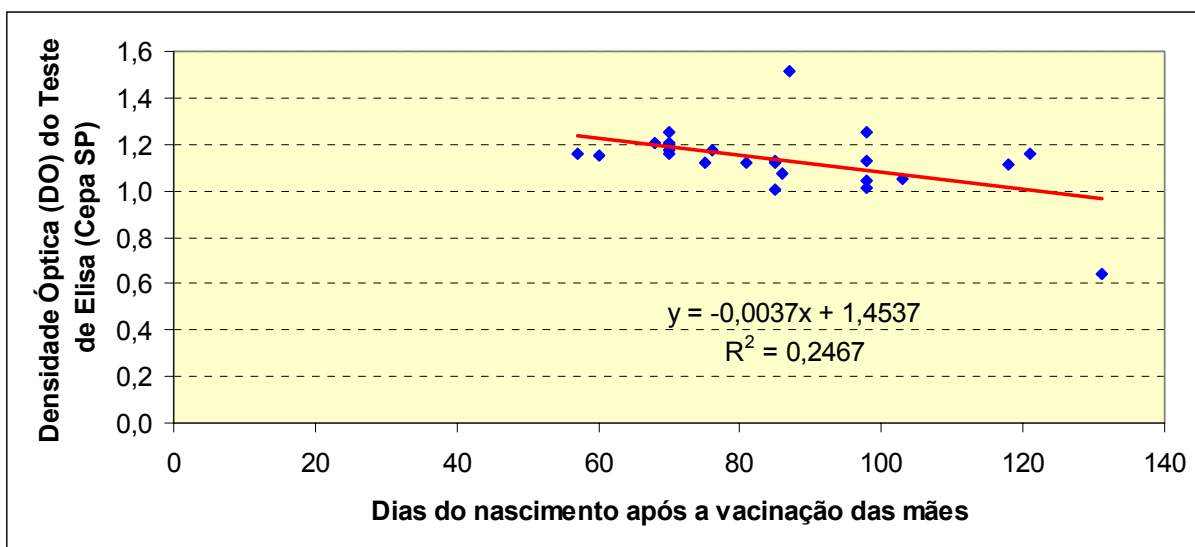


Figura 8. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) pelo teste de Elisa para a cepa de campo (SP) de *Clostridium chauvoei*, em função do dia de nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R^2).

5.2.3 Experimento 3: Resposta sorológica em vacas multíparas com idade superior a 4 anos

As 30 vacas avaliadas apresentaram respostas sorológicas com valores (DO) oscilando entre 0,303 e 1,551 para a cepa de referência (MT) e 0,278 e 1,437 para a cepa de campo (SP). Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) da resposta sorológica quando o antígeno empregado no teste de Elisa foi elaborado com a cepa de referência (MT). A cepa de referência (MT) apresentou uma média e desvio padrão (DO) de $0,788 \pm 0,332$ enquanto a da cepa de campo (SP) foi $0,833 \pm 0,327$.

5.3. Análise *Bayesiana*

Como resultados da inferência *Bayesiana*, os valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) calculados para cada teste estão expressos nas Tabelas 10 e 11, levando-se em consideração intervalo de confiança de 2,5 - 97,5% com 9.500 interações. Os resultados foram semelhantes entre si, com valores próximos de sensibilidade, especificidade e prevalência na detecção de anticorpos vacinais. Por meio desta análise, foram validados os resultados obtidos pelo teste de Elisa indireto sem a presença de um “gold test” ou teste padrão, o que seria impossível em uma análise estatística convencional. As Figuras 9 e 10 ilustram a frequência das interações, revelando um padrão unimodal para sensibilidade, especificidade e prevalência de ambos as técnicas analisadas. Dos valores obtidos, o teste de aglutinação em placas apresentou 98,21%, 94,23% e 90,37% de sensibilidade, especificidade e prevalência, respectivamente. Os valores de sensibilidade e prevalência foram semelhantes para o teste de Elisa indireto, enquanto a especificidade foi inferior na análise *Bayesiana*, revelando 91,4%, entretanto dentro de valores considerados altos nas análises sorológicas. A análise de concordância apresentou-se acima de 90%, caracterizando um resultado desejável entre os dois testes.

Tabela 10. Parâmetros obtidos pela inferência *Bayesiana* após 9.500 interações com os valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) calculados para o teste de aglutinação em placa.

	Média	Média Intervalo confiança (IC)	Desvio padrão (dp)	interações
Se	0,9821	0,9850	$\pm 0,010$	9.500
Sp	0,9423	0,9560	$\pm 0,020$	9.500
Pi	0,9037	0,9051	$\pm 0,050$	9.500

Tabela 11. Parâmetros obtidos pela interferência *Bayesiana* após 9500 interações com os valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) calculados para o teste de Elisa indireto.

	Média	Média Intervalo confiança (IC)	Desvio padrão (dp)	interações
Se	0,9820	0,9849	$\pm 0,012$	9.500
Sp	0,9140	0,9346	$\pm 0,023$	9.500
Pi	0,9030	0,9048	$\pm 0,051$	9.500

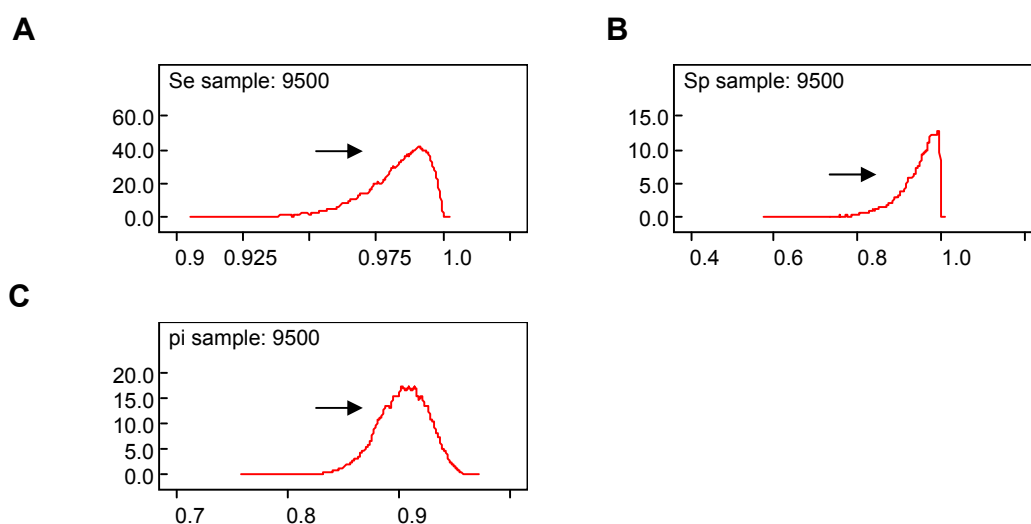


Figura 9. Distribuição dos valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) após 9.500 interações com distribuição unimodal para o teste de aglutinação em placa (valores x = percentagem; y = densidades).

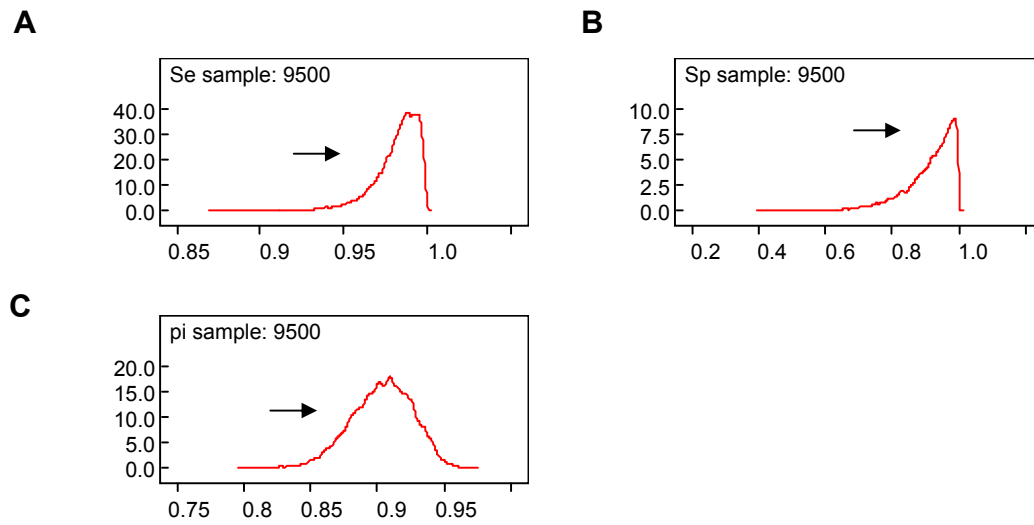


Figura 10. Distribuição dos valores de sensibilidade (se), especificidade (sp) e prevalência (pi) após 9.500 interações com distribuição unimodal para o teste de Elisa indireto (valores x = percentagem; y = densidades).

6 DISCUSSÃO

A vacinação contra o carbúnculo sintomático é uma medida de grande importância na bovinocultura e na ovinocultura, visto que a enfermidade é causa freqüente de mortalidade (ROGERS & SWECKER, 1997). Dessa forma, é necessário que a vacina confira alto grau de imunidade, principalmente em regiões com incidência de surtos da enfermidade.

A vacinação é a principal medida profilática para minimizar a ocorrência da doença nos rebanhos, no entanto, verifica-se que mesmo em rebanhos vacinados há surtos da enfermidade (ROGERS & SWECKER, 1997), embora muitas vezes esses episódios não sejam diagnosticados de maneira correta. A imunização dos animais pode ser realizada a partir dos 4 meses de idade, com reforço 30 dias após a primovacinação, seguida de vacinação anual até 3 anos de idade; após esse período o animal adquiriria imunidade natural (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

O MAPA testa os produtos biológicos comercializados no país e utiliza como normativa a Portaria N° 49 (BRASIL, 1997), que avalia a eficiência da bacterina de *Clostridium chauvoei* presente na vacina frente ao teste de desafio em cobaias vacinadas, empregando-se como antígeno uma cepa de referência (oficial) denominada MT.

Quando submetidos ao teste de desafio, os bovinos apresentam uma proteção igual ou maior contra o *Clostridium chauvoei* em comparação às cobaias, demonstrando que as cobaias são mais sensíveis à infecção causada pelo agente (CLAUS & MACHEAK, 1972b; MACHEAK et al., 1972). Dessa forma, torna-se admissível o emprego de cobaias no teste de controle de qualidade das vacinas contendo bacterinas de *Clostridium chauvoei*.

Os bezerros vacinados com um produto comercial polivalente contra clostridioses apresentaram um aumento significativo da resposta sorológica após a primovacinação e reforço vacinal. Assim, o “booster” vacinal estimulou a produção de anticorpos contra o carbúnculo sintomático.

Os bezerros primovacinados aos 4 meses de idade apresentaram títulos de anticorpos aglutinantes quando avaliados aos 8 meses, ocasião em que receberam o reforço vacinal (Tabela 4). Embora não se saiba o valor mínimo necessário para proteger os animais frente aos desafios naturais do agente etiológico, nessa condição a vacinação dos bezerros já aos 4 meses de idade, seguida do reforço 4 meses após, elevou significativamente os anticorpos.

Aos 10 meses de idade, os três grupos vacinados não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si nos títulos de anticorpos aglutinantes (Tabela 4). Entretanto, os valores de anticorpos foram similares entre G1 e G2, e diferiram significativamente ($p > 0,05$) de G3 quando avaliados pelo teste de Elisa (Tabela 7).

Possivelmente esses valores encontrados são suficientes para a garantia de uma boa imunidade ao rebanho nesse período. Contudo, torna-se necessário reavaliar a duração dessa imunidade e o protocolo de vacinação a partir dos 10 meses de idade, o que não foi objeto deste estudo.

Considera-se que a imunidade natural passiva é de importância para a profilaxia do carbúnculo sintomático, visto que animais com idade inferior a 8 meses raramente desenvolvem o quadro clínico da enfermidade (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

A avaliação da resposta sorológica passiva dos bezerros, filhos de vacas vacinadas contra o *Clostridium chauvoei* pelo menos 30 dias antes do parto, revelou valores significativamente superiores aos bezerros cujas vacas não receberam a vacinação (Tabelas 5 e 8). Os títulos de anticorpos aglutinantes para clostridioses entre os dias 50 e 53 após o nascimento em bezerros foram incrementados quando suas respectivas mães receberam uma dose da vacina comercial aproximadamente 4 meses antes da parição (TROXEL et al., 1997).

Entretanto, esses anticorpos colostrais diminuem significativamente no transcorrer de 3 a 4 meses (SCHIPPER et al., 1978; TROXEL et al., 2001). De fato, a estratégia da imunização natural passiva pelo colostro deve ser viabilizada operacionalmente em nível de rebanho, pois existe uma variação do tempo gestacional das vacas em sistema extensivo de pecuária de corte. Em tal situação deve-se considerar ainda a possibilidade de interferência entre a imunização ativa aos 3 meses de idade e os anticorpos de origem colostrais.

Houve uma correlação linear da resposta sorológica passiva dos bezerros com a época de vacinação das mães e o dia do parto. Assim, a imunização das mães deve ser executada o mais próximo ao parto, com o intuito de elevar os valores de anticorpos passivos detectados nos bezerros. Sob esse aspecto, torna-se relevante a vacinação das fêmeas reprodutoras pelo menos 30 dias antes da parição (2ª dose).

A correlação linear pode ser observada somente quando se empregou o teste de Elisa, cujo antígeno foi preparado a partir de cultivo sonicado de *Clostridium chauvoei* (Tabela 9). Entretanto, quando a avaliação sorológica foi pelo teste de aglutinação em placa, utilizando a bactéria formolizada como antígeno, não houve correlação linear (Tabela 6); isso se deve provavelmente às propriedades distintas dos antígenos empregados em cada técnica, o que teria influenciado na avaliação das respostas sorológicas dos bezerros avaliados.

A ocorrência de anticorpos contra o *Clostridium chauvoei*, com títulos no teste de aglutinação em placa oscilando de 200 a 500, indica que animais adultos não vacinados havia pelo menos 2 anos ainda apresentavam títulos aglutinantes. Acredita-se que a condição imune considerada perpétua de animais adultos estaria relacionada às infecções repetidas causadas pela constante ingestão de esporos da bactéria presentes no solo (KRIEK & ODENDAAL, 2004). No entanto, ainda são escassos os estudos a respeito dessa imunidade natural adquirida pelos animais e ocasionalmente bovinos com idade superior a 3 anos podem contrair a enfermidade.

A inexistência de ações de vigilância epidemiológica para o carbúnculo sintomático, de uma rede laboratorial de diagnóstico veterinário, do hábito dos profissionais em realizarem necropsia e coleta de material, e o pouco controle zootécnico e sanitário nas propriedades rurais, associados ao fato de o teste oficial do MAPA empregar apenas uma única cepa bacteriana (MT) para o desafio em cobaias criam grandes fragilidades que impossibilitam a avaliação da eficácia dos programas de vacinação no país. A isso, acrescenta-se o fato de que dezenas de laboratórios comercializam produtos polivalentes contra clostridioses no mercado nacional, empregando na produção de imunógenos cepas de *Clostridium chauvoei* de diferentes origens. Com base nestas considerações, é possível deduzir que as vacinas comercializadas protegeriam satisfatoriamente os rebanhos contra desafios homólogos, ou ainda contra a cepa de referência (MT).

A ocorrência de episódio de alta mortalidade bovina na Austrália na década de 1970, decorrente provavelmente de falha vacinal, obrigou as autoridades sanitárias daquele país a exigirem a inclusão de cepas de campo representativas nos produtos comerciais (REED & REYNOLDS, 1977).

O emprego de uma cepa de campo no presente trabalho, para avaliação sorológica, decorreu do fato de que em testes anteriores houve diferenças no grau de proteção de cobaias vacinadas com diferentes produtos comerciais desafiados com as cepas de referência (MT) e a cepa de campo (SANTOS, 2003).

A existência de diferenças significativas nas respostas sorológicas dos animais, quando avaliados com uma cepa de campo (Tabelas 4, 5, 7 e 8), traz indicadores importantes para os laboratórios produtores de vacinas e para os órgãos oficiais envolvidos no controle dos produtos comercializados no país.

A falta de conhecimentos técnico-científicos quanto à presença do antígeno O somático termoestável e do antígeno H flagelar termolábil na composição estrutural das cepas de *Clostridium chauvoei* dificulta a fabricação de vacinas mais potentes e capazes de imunizar os animais de forma satisfatória quando desafiados pelas cepas de campo, pois acredita-se que esses antígenos são responsáveis pela imunogenicidade das cepas (MOUSSA, 1959). Outro fator referente à estrutura antigênica do *Clostridium chauvoei* ainda pouco estudado é a composição do componente H, que é específico para cada espécie, tanto bovina quanto ovina (ROBERTS, 1931), embora não se saiba exatamente a sua diferença entre as espécies.

A imunidade protetora contra o *Clostridium chauvoei* é mais antibacteriana que antitóxica, entretanto não se sabe a proporção com que o microrganismo confere um ou outro tipo de imunidade (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1974).

Imunologicamente ignora-se qual o fator que realmente confere melhor proteção frente a desafios heterólogos de grande escala e se há possibilidade desses fatores antigênicos serem utilizados como imunógenos, sem causar enfermidade nos animais. De fato, as vacinas contra o carbúnculo sintomático são bacterinas e contém os antígenos da cultura total do microrganismo.

Dentre todos os fatores relevantes na produção de imunidade contra o *Clostridium chauvoei*, o mais importante é a diferença de proteção que é estimulada pelas vacinas compostas por cepas homólogas às do ambiente e pelas vacinas compostas por cepas heterólogas às encontradas no campo (SCHIPPER et al., 1978).

A vacinação empregando-se cepas homólogas protege melhor contra o desafio homólogo do que contra o desafio heterólogo, pois algumas cepas induzem imunidade com maior espectro de proteção que outras (KERRY, 1967). Deve-se relatar ainda, o fato de algumas cepas parecerem altamente virulentas, devendo-se isso provavelmente ao fato de que vacinas produzidas com cepas laboratoriais, que foram submetidas à repetidas subculturas, perdem seus antígenos e assim modificam-se substancialmente, não conferindo mais a proteção adequada (KERRY, 1967).

Assim, presume-se que o ideal seria a introdução de cepas de campo regionais na fabricação dos produtos comerciais e a melhoria da vigilância epidemiológica, como propõe CHANDLER (1976). Esta dedução pode ser parcialmente consubstanciada pelas diferenças nos resultados da sorologia com o emprego da cepa de campo na avaliação pelos testes de aglutinação em placa e Elisa.

A inexistência de um “gold test”, a dificuldade de um teste de desafio a campo e a ausência de testes sorológicos padronizados para detecção de anticorpos contra o *Clostridium chauvoei* dificultam a avaliação mais consistente dos protocolos vacinais e da eficácia dos produtos. Nesse sentido, o emprego da análise *Bayesiana* possibilitou melhor entendimento dos testes de aglutinação em placa e Elisa na avaliação sorológica de animais vacinados. Embora os valores de sensibilidade e prevalência de anticorpos tenham sido semelhantes e a análise de concordância entre os dois testes foi superior a 90%, possibilitando assim o emprego de ambos na mensuração da resposta sorológica de bovinos contra o *Clostridium chauvoei*, a especificidade foi superior no teste de aglutinação em placa.

O teste de Elisa como método de avaliação da potência das vacinas contendo antígenos de *Clostridium chauvoei* apresenta duas vantagens: redução significativa do número de cobaias utilizadas e a estimativa de forma quantitativa da potência das vacinas, quando comparado ao teste desafio em cobaia (CRICHTON et al., 1990).

Há uma relação entre títulos de aglutinação e imunogenicidade em bovinos vacinados empregando-se vacinas experimentais e comerciais contendo bacterinas de *Clostridium chauvoei* e desafiados experimentalmente. A imunidade protetora é considerada satisfatória quando se torna necessário 0,5 µL de soro bovino para realizar a completa aglutinação de 50 µL do antígeno padrão composto por *Clostridium chauvoei* (MACHEAK et al., 1972).

Os resultados do presente trabalho revelaram alguns aspectos inéditos na literatura e certamente de valor para os programas de saúde animal, com aplicação prática e de importância na prevenção da doença, apresentando assim subsídios para a execução de programas de vacinação contra o carbúnculo sintomático e para a fabricação de produtos biológicos de qualidade assegurada.

7. CONCLUSÕES

Os resultados da resposta sorológica dos bovinos contra o *Clostridium chauvoei*, empregando-se a cepa de referência (MT) e uma cepa de campo (SP) como antígenos, avaliados pelo teste de aglutinação em placa e Elisa, permitiram concluir que:

- a) independente dos protocolos empregados na vacinação de bezerros contra o carbúnculo sintomático, a resposta sorológica foi similar aos 10 meses de idade.
- b) a primovacinação dos bezerros aos 4 meses de idade e reforço na desmama (8 meses) apresentou a melhor resposta sorológica quando comparado com outros protocolos.
- c) independente das vacinas empregadas na imunização ativa das mães, a resposta sorológica passiva dos bezerros foi similar até os 3 meses de idade.
- d) houve uma correlação linear da resposta sorológica passiva dos bezerros com a data de vacinação das mães e o dia do parto, quando empregado o teste de Elisa.
- e) todas as vacas com idade superior a 4 anos avaliadas apresentaram resposta sorológica contra o *Clostridium chauvoei*.
- f) a resposta sorológica dos bovinos foi significativamente inferior quando empregou-se a cepa de campo (SP) como antígeno em dois momentos da avaliação no G3 do primeiro experimento, em dois no V2 do segundo experimento e no terceiro experimento do teste de aglutinação em placa. Quando empregado o teste de Elisa, tal situação foi constatada em dois momentos no G1, um no G3 e três no controle do primeiro experimento, e um no controle do segundo experimento.
- g) a resposta sorológica dos bovinos foi significativamente inferior quando empregou-se a cepa de referência (MT) como antígeno em um momento da avaliação no G1 e outro no G2 do primeiro experimento, e no terceiro experimento do teste de Elisa.

- h) independente dos testes empregados na mensuração da resposta sorológica dos bovinos, os valores de sensibilidade e prevalência de anticorpos foram similares e a análise de concordância foi superior a 90%.

8 REFERÊNCIAS

BAGADI H.O. The relationship between the annual rainfall and outbreaks of black quarter of cattle in northern Nigeria **Tropical Animal Health and Production**, v. 10, p. 124-126, 1978.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**, cidade: São Paulo, Edições Melhoramentos, p. 1056, 1980.

BISPING W.; AMTSBERG G. **Colors Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals**, cidade: Berlim, Paul Parey Scientific Publishers, p.82, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 49 de 12 de maio, 1997**. Brasília, p. 10168, 1997. Seção 01.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 01 de 15 de janeiro, 2003**. Brasília, n. 70, p. 10-13, 2003. Seção 01.

BROWN, K.K.; PARIZEK, R.E.; STEWART, R.C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, v.71, p. 1717-1721, 1976.

CAMERON, C.M.; BOTHA, W.J.S.; SCHOEMAN, H. Immunization of guinea pigs and cattle with a reduced dose *Clostridium chauvoei* vaccine produced in a semi synthetic medium. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 151-153, 1986.

CHANDLER, H. M. Some observations on the quality control testing of *Clostridium chauvoei* vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v. 82, p. 137-141, 1976.

CHANDLER, H.M.; GULASEKHARAM, J. An evaluation of characteristics of *Clostridium chauvoei*, which possibly indicate a highly protective strain. **Australian Journal of Experimental Medicine and Science**, v. 48, p. 187-197, 1970.

CHANDLER, H.M.; GULASEKHARAM, J. A study of the protective antigen of a highly immunogenic strain of *Clostridium chauvoei* including an evaluation of its flagella as a protective antigen. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p. 128-134, 1974.

CHANDLER, H.M.; HAMILTON, R.C. The protective antigenicity of protoplasts and spheroplasts of a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. **Journal of Genetics Microbiology**, v. 88, p. 179-183, 1975.

CLAUS, K. D.; MACHEAK, M. E. Characteristics and immunizing properties of culture filtrates of *Clostridium chauvoei*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 1031-1038, 1972a.

CLAUS, K.D.; MACHEAK, M.E. Preparation of a *Clostridium Chauvoei* antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 1045-1052, 1972b.

CORTIÑAS, T.I.; MICALIZZI, B.; GUZMÁN, A.M.S. Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 382-387, 1994.

CRICHTON, R.; SOLOMON, J.; BARTON, A.M. The Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring the potency of Vaccines Cointaing *Clostridium chauvoei* Antigens. **Biologicals**, v. 18, p. 49-54, 1990.

DODSON, L. F. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 598, 1978.

ERASMUS, B.J.; CAMERON, C.M.; HUNTER P.; CILLIERS J.A.; OBEREM P.T.; STOLTSZ W.H.; DE WAAL, D.T. **Onderstepoort vaccines**. Pretoria: Department of Agriculture and Development , 1990.

GLASTONBURY, J.R.W.; SEARSON, J.E.; LINKS, I.J.; TUCKETT, L.M. Clostridial myocarditis in lambs. **Australian Veterinary Journal**, v.65, p. 208-209, 1988.

GREEN, D.S.; GREEN, M.J.; HILLYER, M.H.; MORGAN, K.L. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. **Veterinary Record**, v. 120, p. 435-439, 1987.

HAGEMOSER, W.A.; HOFFMAN, L.J.; LUNDVALL, R.L. *Clostridium chauvoei* infection in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, p. 631--633, 1980.

HAUER, P.J.; WHITAKER, M.S.; HENRY, L.A. A serological potency assay for *Clostridium chauvoei*. **Developments in Biological Standardization**, v. 86, p. 332, 1996.

HENDERSON, D.W. Studies on *Clostridium chauvoei*. In: The analysis of the "H" and "O" antigens of *Clostridium chauvoei*. **Carnegie Research Fellow**, p. 412-420, 1932.

HENNING, M.W. **Animal Disease in South Africa**, 3rd ed. Pretoria: Central News Agency, 1956.

HULLAND, T.J. Muscle and tendons. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**, 4th ed. San Diego: Academic Press, 1993.

KERRY, J.B. A note on the occurrence of *Clostridium chauvoei* in the livers and spleens of normal cattle. **Veterinary Record**, v. 76, p. 396, 1964.

KERRY, J.B. Immunological differences between strains of *Clostridium chauvoei*. **Research Veterinary Science**, v. 8, p. 89-97, 1967.

KNOTT, G.K.L.; ERWIN, B.G.; CLASSICK, L.G. Benefits of a clostridial vaccination program in feedlot cattle. **Veterinary Medicine**, v. 80, p. 95-97, 1985.

KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. *Clostridium chauvoei* infections. In: COETZER, R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of Livestock**. Cape Town. Oxford Press, vol 3, p. 1856-1862, 2004.

KUHNERT, P.; KRAMPE, M.; CAPAUL, S. E.; FREY, J.; NICOLET, J. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 2/3, p. 291-298, 1997.

LIMA, F.G.F. Tipos de Colônia e Características Bioquímicas de Cultura de *Clostridium chauvoei* isoladas de Bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 3/4, p. 65-69, 1992.

MACHEAK, M.E.; CLAUS, K.D.; MALOY, S.E. Potency testing *Clostridium chauvoei* – containing bacteris: relationship of agglutination titers and potency tests in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 1053-1058, 1972.

MATTAR, M.A.; CORTIÑAS, T.I.; GUZMÁN, A.M.S. Immunogenic protein variations of *Clostridium chauvoei* cellular antigens associated with the culture growth phase. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p. 9-14, 2002.

McFARLANE, B.J.; STOKKA, G.L.; BASARABA, R. Injection site reactions to the use of Clostridial Vaccines. **Food Animal**, v. 57-59, 1996.

MICALIZZI, B.; GUZMÁN, A.M.S. Protective activity of different immunosera against *Clostridium chauvoei*. **Anaerobe**, v. 3, p. 127-129, 1997a.

MICALIZZI, B.; GUZMÁN, A.M.S. Immunogenicity of an extract of *Clostridium chauvoei* in guinea pigs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25 (Suppl. 2), p. 171-172, 1997b.

MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 77, p. 341-350, 1959.

PEMBERTON, J.R.; BATES, F.; MATSON, R.; MACHEAK, M.E.; HIGBE, J. Changes in clinical values of cattle infected with *Clostridium chauvoei*: Clinical relationships during infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 1041-1044, 1974.

PROVOST, A.; PERREAU, P. Combined vaccines in veterinary medicine in the developing countries. **Developments in Biological Standardization**, v. 41, p. 349-360, 1978.

QUINN, P.I.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**, p. 200, 1994.

REED, G.A.; REYNOLDS, L. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 393, 1977.

ROBERTS, R.S. Ovine and bovine strains of *B. chauvoei*. **Journal Comparative Pathology**, v. 44, p. 246-251, 1931.

ROGERS, G.M.; SWECKER, W.S.JR. Clostridial Vaccines: Timing and Quality Assurance. **Food Animal**, p. 278-285, 1997.

SANTOS, B.A. **Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil**. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal. 35f, 2003.

SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc^R**, Version 8. Cary: 1999.

SCHIPPER, I.A.; KELLING, C.L.; MAYER, J.; PFEIFFER, N.W. Effects of passive immunity on immune response in calves vaccinated against *Clostridium chauvoei* infection (blackleg). **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, v. 73, p. 1564-1566, 1978.

SIPPEL, W.L. Diagnosis of clostridial diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 161, p. 1299-1305, 1972.

SMITH, L.D.S.; WILLIAMS, B.L. **The Pathogenic Anaerobic Bacteria**, 3rd ed., Springfield, Illinois: Charles C. Thomas. 1984.

STEPHEN, J.; PIETROWSKI, R.A. Bacterial toxins, 2nd ed., Washington: **American Society for Microbiology**, 1986.

STERNE, M. Clostridial infections. **British Veterinary Journal**, v. 137, p. 443-454, 1981.

STERNE, M.; BATTY, I.; THOMPSON, A.; ROBERTSON, J.M. Immunization of sheep with multi-component clostridial vaccines. **Veterinary Record**, v. 74, p. 909-913, 1962.

STEVENSON, J.R.; STONGER, K.A. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 650-652, 1980.

TAMURA, Y.; TANAKA, M.K.; AOKI, A.; OGIKUBO, Y.; TAKAHASHI, T. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. **Microbiology**, v. 141, p. 605-610, 1995.

TILLERAY, J.H. and KNIGHT, P.A. Prospects for the refinement and reduction of animal usage in the potency testing of *Clostridium chauvoei* vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v. 64, p. 111-118, 1986.

TROXEL, R.; BURKE, G.L.; WALLACE, W.T.; KEATON, L.W.; McPEAKE, S.R.; SMITH, D.; NICHOLSON, I. Clostridial Vaccination Efficacy on Stimulating and Maintaining an Immune Response in Beef Cows and Calves. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 19-25, 1997.

TROXEL, R.; GADBERRY, M.S.; WALLACE, W.T.; KREIDER, D.L.; SHOCKEY, J.D.; COLBURN, E.A.; WIDEL, P.; NICHOLSON, I. Clostridial antibody response from injection-site in lesions in beef cattle, long-term response to single or multiple dose, and response in newborn beef calves. **American Society of Animal Science**, v. 79, p. 2558-2564, 2001.

WOOLCOCK, J.B.; FROST, A.J. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 319, 1977.

9 ANEXOS

9.1 Teste de Aglutinação em Placa

9.1.1 Anexo I - Meio de Cultura

Preparação Meio de Cultura para *Clostridium chauvoei*

Extrato de Carne.....	20,0 g
Peptona.....	10,0 g
Amido Solúvel.....	1,0 g
Glicose.....	1,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl).....	5,0 g
Cloridrato de L-cisteína (Cysteina HCL).....	0,3 g
Água Destilada.....	1.000 mL

* Ajustar o pH a 7,2.

* Esterilização: Autoclave a 121°C por 15 minutos.

9.1.2 Anexo II - Solução Salina Tamponada (pH 7,0)

Cloreto de Sódio (NaCl).....	8,5 g
Solução de Fosfato Bibásico de Sódio (Na_2HPO_4) (molaridade/15).....	30 mL
Solução de Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4) (molaridade/15).....	20 mL
Formalina 0,1%.....	0,1 mL
Água Destilada.....	1.000 mL

9.2 Teste de Elisa

9.2.1 Anexo III - Soluções utilizadas na Produção do Antígeno de *Clostridium chauvoei*.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - DPBS (pH 7,3)

Cloreto de Sódio (NaCl).....	8,0 g
Cloreto de Potássio (KCl).....	0,2 g
Cloreto de Cálcio Bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0,13 g
Cloreto de Magnésio Hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	0,1 g
Fosfato Bibásico de Sódio Bi-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	1,15 g
Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4).....	0,2 g
Água Destilada.....	1.000 mL

Solução Tamponada de Fosfato de Sódio (pH 8,9)

Fosfato Bibásico de Sódio Bi-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	7,2 g
Água Destilada.....	1.000 mL

9.2.2 Anexo IV - Soluções utilizadas na Padronização e no Procedimento do Teste.

Tampão Carbonato-Bicarbonato - TCB (0,05 M e pH 9,6)

Carbonato de Sódio (Na_2CO_3).....	1,6958 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3).....	2,8563 g
Água Destilada.....	1.000 mL

Phosphate Buffered Saline - PBS (pH 7,0 a 7,4)

Cloreto de Sódio (NaCl).....	15,74 g
Fosfato Bibásico de Sódio (Na ₂ HPO ₄).....	1,419 g
Fosfato Monobásico de Sódio (NaH ₂ PO ₄).....	1,379 g
Água Destilada.....	1.000 mL

Phosphate Buffered Saline Tween (PBS-T) 0,05%

Cloreto de Sódio (NaCl).....	15,74 g
Fosfato Bibásico de Sódio (Na ₂ HPO ₄).....	1,419 g
Fosfato Monobásico de Sódio (NaH ₂ PO ₄).....	1,379 g
Tween 80.....	0,5 ml
Água Destilada.....	1.000 mL

Tampão Citrato Fosfato (pH 4,9 a 5,2)

* Solução A

Fosfato Bibásico de Sódio (Na ₂ HPO ₄).....	11,9 g
Água Destilada.....	1.000 mL

* Solução B

Ácido Cítrico.....	7,0 g
Água Destilada.....	1.000 mL

* 5,5 ml da Solução A + 7,0 ml da Solução B + 50 µl H₂O₂ 3% + 5 mg OPD (orto-fenileno-diamina) → Solução Cromógeno do teste (1 placa).