

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA
CLOSTRIDIUM SEPTICUM COMERCIALIZADAS NO BRASILF.C.F. Lobato¹, L.D. Dias¹, F.M. Salvarani¹, N.É. Martins¹, R.A.P. do Nascimento², R.A. de Assis²

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br

RESUMO

Clostridium septicum, um organismo ubiqüitário, é o principal patógeno responsável pelo quadro de edema maligno. Devido à ação citotóxica da toxina alfa as infecções geralmente são fatais. Para o controle da doença é utilizada a vacinação com toxóide alfa. Neste trabalho, avaliou-se a eficiência de 12 vacinas comerciais contra clostridioses, que continham em sua composição *C. septicum*, através da soroneutralização em camundongos com soros de coelhos e bovinos vacinados. As vacinas codificadas como T1, T2, T4, T10 e T11 apresentaram títulos de antitoxina alfa superiores ao nível mínimo exigido pelo teste de 2,5 UI/mL. As demais vacinas não induziram a formação de anticorpos. Em sua maioria, as vacinas comercializadas no Brasil, contra *C. septicum*, foram ineficientes em estimular resposta imune compatível com os níveis de teste recomendados para controle deste produto.

PALAVRAS-CHAVE: Vacina, toxina alfa, *Clostridium septicum*, gangrena gasosa, clostridioses.

ABSTRACT

EVALUATION OF POTENCY OF VACCINES AGAINST *CLOSTRIDIUM SEPTICUM* COMMERCIALIZED IN BRAZIL. *Clostridium septicum*, a ubiquitous organism, is the main pathogen causing malignant edema. Because of its strong cytotoxic alpha toxin, infections are often lethal. Losses in livestock can be prevented through vaccination with alpha-toxoid vaccines. The antibody response to the *C. septicum* component of 12 commercial vaccines was evaluated by the mouse serum neutralization test using rabbit and bovine sera. The vaccines coded as T1, T2, T4, T10 and T11 induced titers of alpha antitoxin higher than the minimum test level of 2.5 IU/mL. None of the other vaccines induced the formation of antibodies. The majority of the *C. septicum* vaccines commercialized in Brazil were unable to induce an immune response as recommended for the control of this product.

KEY WORDS: Vaccine, alpha toxin, *Clostridium septicum*, gas gangrene, clostridiosis.

Clostridium septicum é um dos principais agentes etiológicos responsável pelo quadro de gangrena gasosa ou edema maligno, enfermidade altamente letal para ruminantes e outras espécies animais. Como todas as espécies do gênero *Clostridium* são ubiqüitários, e têm a propriedade de permanecer por longo período no solo na forma de esporos, e em condições favoráveis, proliferam-se rapidamente e produzem toxinas. O microrganismo produz cinco toxinas: alfa, beta, gama, delta e uma neuramidase, sendo a toxina alfa considerada a mais importante delas na patogenia da doença, por sua ação hemolítica, necrótica e letal (HATEWAY, 1990).

No período de janeiro de 1990 a agosto de 2005 foram registrados, segundo o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais, 14.895 casos de mionecroses, representadas pelo carbúnculo sintomático e gangrena gasosa (OLINDA, comunicação pessoal). Segundo relato de LIMA *et al.* (2006), 40 ovinos e 30 caprinos de um rebanho de 1.200 animais vieram a óbito em um surto da doença.

A utilização de imunógenos tem reduzido, em grande parte, a mortalidade e conseqüentes perdas econômicas relacionadas as clostridioses. As vacinas comercializadas no Brasil são compostas de múlti-

²Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

plos antígenos e as normas para controle dessas vacinas estão definidas na legislação do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1997). Em relação ao *C. septicum*, exige-se nível mínimo de antitoxina alfa de 2,5 UI/mL, determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos por meio da titulação de soros de coelhos vacinados (BRITISH PHARMACOPEIA, 1998).

No Brasil são produzidas em torno de 140 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, comprovando a grande utilização desses imonógenos. Entretanto, apenas as vacinas contra *Clostridium chauvoei* e *Clostridium botulinum* são submetidas ao controle oficial pelo MAPA. Em razão da importância de *C. septicum* como principal agente da gangrena gasosa, aliada à inexistência de controle oficial que ateste a qualidade das vacinas produzidas no país, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potência de 12 vacinas que continham em sua composição toxóide alfa de *C. septicum*, disponíveis para comercialização no mercado brasileiro.

Foram adquiridas diretamente do comércio nacional 12 vacinas contra clostridioses que apresentavam na sua composição *C. septicum*. Após avaliação das condições de conservação no revendedor e prazo de validade, estas foram mantidas de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle positivo, foi utilizado toxóide padrão, adquirido do National Institute Biological Standards and Control (NIBSC, Inglaterra) e como controle negativo, foi empregado salina estéril a 0,85% (Tabela 1).

Para produção da toxina alfa, a amostra de referência de *C. septicum*-ATCC 12464 (Rockville, Maryland, EUA) foi cultivada em um meio de produção de toxina (KOLBE; HAUER, 1995), em atmosfera de anaerobiose a 37° C por 24 horas. A cultura obtida foi centrifugada a 7000 x g por 30 min e o sobrenadante concentrado 80 vezes por ultrafiltração com membrana de retenção de 10 KDa. À toxina concentrada foi adicionado o inibidor de protease, na proporção de 10 mM/L, e armazenadas a -80° C até o uso. A toxina foi padronizada no nível de teste de L+/5 (menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,2 UI de antitoxina padrão homóloga e inoculada em camundongos por via endovenosa, causa morte dos animais em 72 horas) preconizado pela BRITISH PHARMACOPEIA (1998).

Na avaliação sorológica, para cada vacina, foram utilizados 10 coelhos adultos, raça Nova Zelândia, do sexo feminino, com pesos entre 1,8 e 2,6 kg e seis bovinos com idade entre 10-11 meses, raça Nelore, do sexo feminino, com peso entre 90 e 105 kg. Os coelhos foram vacinados nos dias zero e 21 com a menor dose recomendada pelo fabricante. A sangria foi realizada no 35º dia após primo-vacinação e os soros foram misturados em partes iguais, constituindo-se um pool

para cada grupo (BRASIL, 1997). Os bovinos, sem histórico de vacinação contra *C. septicum* e negativos ao teste de soroproteção em camundongos (TAMMEMAGY; GRANT, 1967), foram vacinados nos dias zero e 42 com a dose recomendada pelo fabricante. Estes foram sangrados nos dias 42 e 56 após a primo-vacinação. Em cada sangria, os soros dos seis bovinos foram misturados em partes iguais, constituindo-se um pool para cada grupo. Todos os soros foram mantidos a -20° C até a realização dos testes.

Os pools dos soros dos coelhos e dos bovinos foram submetidos a uma triagem, pela técnica de soroproteção em camundongos, frente a 2,5 DL₅₀ de toxina alfa (TAMMEMAGY; GRANT, 1967). Os soros que protegeram os camundongos foram titulados pela técnica de soroneutralização em camundongos (BRITISH PHARMACOPEIA, 1998), empregando nível de teste de L+/5. Como controle dos testes, foi utilizada antitoxina alfa padrão contendo 10 UI/mL, adquirida do NIBSC (Inglaterra). A utilização dos animais nesta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo número 105/2004.

Na padronização da toxina alfa, no nível do teste empregado, obteve-se 178 L+/5/mL e cada L+/5 continha 10,7 DL₅₀, atingindo o nível mínimo exigido pela BRITISH PHARMACOPEIA (1998) de 10 DL₅₀.

Os resultados do teste de eficiência das vacinas comerciais, expresso em UI/mL de antitoxina alfa de *C. septicum* nos pools dos soros de coelhos, positivos no teste de soroproteção, são apresentados na Tabela 2.

O pool de soros dos coelhos imunizados com o toxóide alfa padrão, controle do teste, apresentou resultado igual ou superior a 5 UI/mL de antitoxina alfa. Resultados semelhantes foram observados com as vacinas T10 e T11, enquanto T1 e T2 apresentaram títulos igual a 5 UI/mL e T4 apresentou 2,5 UI/mL, título mínimo exigido no teste de potência. As demais vacinas não conferiram proteção aos camundongos inoculados, sendo ineficientes em elicitar a produção de anticorpos protetores.

Os "pools" de soros dos bovinos vacinados com T1, T2, T4, T10 e T11, positivos ao teste de soroproteção, foram submetidos à prova de soroneutralização em camundongos e os títulos de antitoxina alfa são apresentados na Tabela 3. A titulação dos soros dos bovinos, após a segunda dose da vacina, confirma a necessidade da dose de reforço para se estabelecer imunidade adequada para *C. septicum*, conforme demonstrado por KERRY; GRAIG (1979). Resultados semelhantes foram observados por AZEVEDO *et al.* (1998) e LOBATO *et al.* (2000) em vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D, por NASCIMENTO *et al.* (2004) para vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B e por LOBATO *et al.* (2004) para vacinas contra *Clostridium sordellii*.

Tabela 1 - Composição das vacinas contra clostridioses adquiridas no comércio e controles analisados.

| Vacina | Composição |
|-------------------|---|
| T 1 | <i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>Clostridium sordellii</i> , <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D |
| T 2 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D |
| T 3 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D, <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D |
| T 4 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>Clostridium haemolyticum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D |
| T 5 ¹ | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D |
| T 6 ¹ | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. botulinum</i> tipos C e D |
| T 7 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> e <i>C. perfringens</i> tipos B e D |
| T 8 | <i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D |
| T 9 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D |
| T 10 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D |
| T 11 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. perfringens</i> tipos C e D |
| T 12 | <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> |
| Controle positivo | Toxóide alfa padrão de <i>C. septicum</i> |
| Controle negativo | Salina estéril a 0,85% |

¹Vacinas produzidas pelo mesmo fabricante.

Tabela 2 - Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium septicum* em pool de soros de coelhos¹ obtidos aos 35 dias após a primeira vacinação² com vacinas comerciais e toxóide padrão.

| Vacina | Antitoxina alfa (UI/mL) |
|----------------|-------------------------|
| T1 | 5 |
| T2 | 5 |
| T4 | 2,5 |
| T10 | > ou igual a 5 |
| T11 | > ou igual a 5 |
| Toxóide padrão | > ou igual a 5 |

¹Positivos ao teste de soroproteção em camundongos.

²Vacinados nos dias 0 e 21.

A utilização do teste de soroproteção em camundongos, para triagem dos soros dos coelhos e bovinos, permitiu uma redução significativa no número de animais de laboratório utilizados no experimento. Pela mesma razão, esse teste também foi empregado por diversos outros trabalhos (LOBATO, 1989; AZEVEDO *et al.*, 1998; LOBATO *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Autores têm demonstrado que a principal fração de *C. septicum* responsável por elicitar anticorpos protetores é a toxina alfa (BALLARD *et al.*, 1992; AMIMOTO *et al.*, 2002). Eles avaliaram e comprovaram a maior eficiência de vacinas contendo somente a toxina alfa

Tabela 3 - Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium septicum* em pool de soros de bovinos¹ obtidos aos 42 e 56 dias após a primeira vacinação com vacinas comerciais e toxóide padrão.

| Vacina | Antitoxina alfa (UI/mL) | |
|-------------------|-------------------------|----------------|
| | Dia 42 ² | Dia 56 |
| T1 | 0,1 | 5 |
| T2 | 0,1 | 5 |
| T4 | 0,1 | 2,5 |
| T10 | 0,1 | > ou igual a 5 |
| T11 | 0,1 | > ou igual a 5 |
| Controle positivo | 0,1 | > ou igual a 5 |

¹Positivos ao teste de soro proteção em camundongos.

²Dose reforço da vacina.

purificada e inativada. Entretanto, apesar de neste estudo não ter sido feito desafio de animais com esporos de *C. septicum*, teste que tem sido usado para avaliar a capacidade protetora do antígeno somático (LOBATO *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2004), BENTACOR *et al.* (2002) demonstraram que a vacina contra *C. septicum* que continha em sua composição apenas o componente somático foi mais eficiente que a vacina que continha apenas a toxina alfa. Mediante esses resultados, sugeriram a reformulação de vacinas contra *C. septicum*, de forma a não conterem somente toxóide alfa.

No Brasil, vários trabalhos foram realizados para avaliar a eficiência das vacinas clostridiais comercializadas (LOBATO, 1989; AZEVEDO *et al.*, 1998; LOBATO *et al.*, 2000; LOBATO *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2004) e, adicionalmente com o presente experimento com *C. septicum*, têm demonstrado que, em sua maioria, as vacinas contra clostridioses não induzem respostas imunes protetoras.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, em sua maioria, as vacinas comercializadas no Brasil, contra *C. septicum*, foram ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado para este produto, indicando a necessidade urgente do controle da eficiência destes imunógenos.

REFERÊNCIAS

- AMIMOTO, K. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccina against challenge with spores guinea pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, n.1, p.67-69, 2002.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E.; NASCIMENTO, R.A.P.; ABREU, V.L.V.; UZAL, F.A. An outbreak of malignant edema in cattle. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, n.543, p.143-145, 2002.
- AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; MAIA J.D.; NASCIMENTO, R.A.P. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.
- BALLARD, J.; BRYANT, A.; SETEVENS, D.; TWETEN, R.K. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity*, v.60, p.784-790, 1992.
- BENTACOR, L.D.; CAIRÓ, F.M.; CARLONI, G. Importância del soma bacteriano en la formulacion de vacunas contra gangrena gaseosa. *Veterinaria Argentina*, v.189, p.667-672, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, 12 de maio de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- BRITISH PHARMACOPEIA. *Veterinary antisera and veterinary vaccines*. London: Department of Health and Social Security, Medicines Commission, 1998.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Review*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- KERRY, J.B.; CRAIG, G.R. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. *Veterinary Record*, v.105, n.24, p.551-554, 1979.
- KOLBE, D.R.; HAUER P.J. *Media and reagents used to cultivate and identify obligately anaerobic bacteria*. Center for Veterinary Biologics-Laboratory. Ames: APHIS, 1995.
- LIMA, C.G.R.D.; SALVARANI, F.M.; SILVA, D.F.M.; ASSIS, R.A.; COSTA, J.N.; LOBATO, F.C.F. Surto de gangrena gasosa em rebanho de ovinos e caprinos. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.9, n.2, p.106-109, 2006.
- LOBATO, F.C.F. *Avaliação de imunógenos antitoxinogênicos em uso no Brasil*. 1989. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.
- LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R.A.; MARTINS, N.E.; GONÇALVES, L.C.B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.4, p.313-318, 2000.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; BALSAMÃO, G.M.; ABREU, V.L.V.; NASCIMENTO, R.A.P.; NEVES, R.D. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.439-442, 2004.
- NASCIMENTO, R.A.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; MARTINS, N.E.; ASSIS R.A.; CARVALHO FILHO, M.B. Avaliação de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.1, p.1-6, 2004.
- TAMMEMAGY, L.; GRANT, K.M. Vaccination in the control bovine botulism in Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v.43, n.9, p.368-373, 1967.

Recebido em 20/8/07

Aceito em 19/5/08