

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARBÚNCULO SINTOMÁTICO: ABORDAGEM  
DIAGNÓSTICA E IMUNOLÓGICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Luana D'Avila Farias**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**CARBÚNCULO SINTOMÁTICO: ABORDAGEM  
DIAGNÓSTICA E IMUNOLÓGICA**

**por**

**Luana D'Avila Farias**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Agueda Castagna de Vargas, Dr.**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

F224c Farias, Luana D'Avila  
Carbúnculo sintomático : abordagem diagnóstica e imunológica / por Luana  
D'Avila Farias. – 2011.  
60 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Agueda Palmira Cartagna de Vargas  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de  
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2011

1. Medicina veterinária 2. Bovinos 3. Eficiência vacinal 4. Diagnóstico  
Laboratorial 5. *Clostridium chauvoei* I. Vargas, Agueda Palmira Cartagna de  
II. Título.

CDU 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109  
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**  
**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARBÚNCULO SINTOMÁTICO: ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E  
IMUNOLÓGICA**

elaborada por  
**Luana D'Avila Farias**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**Comissão Examinadora:**

  
**Agueda Castagna de Vargas, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

  
**Mateus Matiuzzi da Costa, Dr. (UNIVASF)**

  
**Sônia de Avila Botton, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À professora Agueda Castagna de Vargas, pela orientação e ensinamentos recebidos durante o período de execução deste trabalho.

Às professoras Sônia Botton e Fernanda Vogel pelas sugestões, opiniões e auxílio na composição do trabalho.

Aos professores Mateus Matiuzzi, Geder Hermann e Cristina Krewer e às colegas Franciele Maboni e Flávia Stefanello por sempre estarem prontos a doar seus conhecimentos e seu tempo em prol da pesquisa.

À minha família em especial aos meus pais Érico e Rosa por sempre prezarem pela boa educação e acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado Mauro Mello, pelo companheirismo, paciência e apoio, principalmente na reta final do trabalho pelas noites em claro no laboratório.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia da Medicina Veterinária Preventiva principalmente à Letícia Gressler, Angela Decian, Felipe Libardone, Carlos Eugênio Vidal e Gustavo Machado pela assistência em questões que me eram incompreensíveis. Às colaboradoras da iniciação científica por manterem o laboratório sempre em bom funcionamento e prezarem pelo bem estar dos animais utilizados na experimentação científica.

A todos o meu agradecimento.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CARBÚNCULO SINTOMÁTICO: ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E IMUNOLÓGICA**

AUTORA: Luana D'Avila Farias  
ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas  
Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011.

O carbúnculo sintomático é uma infecção aguda e geralmente fatal que acomete principalmente os bovinos, cujo agente etiológico é *Clostridium chauvoei*. Neste estudo foram apresentados dois experimentos, o primeiro com o objetivo de facilitar a coleta e armazenamento de material em papel filtro comum, para diagnóstico laboratorial do carbúnculo sintomático por PCR (*polymerase chain reaction*) direta. Para isto, foram testadas, *in vitro*, a sensibilidade, especificidade e viabilidade do método em decorrência do tempo e à temperatura ambiente. Para o teste de viabilidade, foram utilizados os tecidos hepáticos de doze bovinos, sendo dez impregnados com uma suspensão de *C. chauvoei*. Os testes foram realizados nos períodos de 24h, 48h, 72h e uma semana após impregnação do papel filtro comum armazenado à temperatura ambiente. A sensibilidade da técnica não foi comprometida com o uso do papel filtro comum. Não foram observadas reações cruzadas e ampliações a partir das amostras controle negativas. A PCR direta do papel filtro comum apresentou amplificação em 50% das amostras nas 24h, 100% nas 48h, 70% nas 72h e 90% no período de uma semana de armazenamento à temperatura ambiente. Este método demonstrou ser uma alternativa prática e econômica para coleta, armazenamento e remessa de material para diagnóstico molecular de carbúnculo sintomático. O segundo experimento teve como objetivo verificar a eficiência da imunização proporcionada por duas vacinas clostridiais polivalentes (vacinas A e B) testadas frente à cepa de campo (SBP 07/09) e a cepa de referência (MT) de *C. chauvoei*. Os testes ocorreram por meio do desafio em cobaias imunizadas, utilizado oficialmente pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e posteriormente foi avaliada a resposta humoral dos animais pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Ao final do experimento, todas as cobaias vacinadas estavam vivas e sem sinais clínicos da doença, enquanto os animais dos grupos controle apresentaram sinais característicos da doença e morreram no período de 24 a 48 horas. As vacinas testadas foram eficientes em estimular resposta humoral tanto frente à cepa de campo de *C. chauvoei* quanto frente à cepa de referência MT. Quanto à resposta humoral evidenciada pelo ELISA, os quatro grupos vacinados e desafiados soroconverteram após a vacinação e os animais do grupo controle permaneceram soronegativos. Contudo, os animais imunizados com a vacina B apresentaram maiores níveis de anticorpos detectados quando comparados com os animais imunizados com a vacina A. O presente trabalho trouxe contribuições no processo de prevenção e desenvolvimento de métodos diagnósticos para o carbúnculo sintomático, uma relevante doença, tanto do ponto de vista econômico quanto da saúde animal.

Palavras-chave: Diagnóstico laboratorial; eficiência vacinal; PCR; *Clostridium chauvoei*.

## ABSTRACT

Master of Science  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **BLACKLEG: DIAGNOSTIC AND IMMUNOLOGICAL APPROACHES**

AUTORA: Luana D'Avila Farias  
ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas  
Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011.

Blackleg is an acute and often fatal infection that affects mainly cattle, whose causative agent is *Clostridium chauvoei*. In this study two experiments were presented, the first with the aim of facilitating the collection and material storage in common filter paper for laboratory diagnosis of blackleg by using PCR (polymerase chain reaction). For this we tested *in vitro*, the sensitivity, specificity and feasibility of this method over different storage periods at room temperature. For the viability test we used twelve bovine liver tissues which ten samples were impregnated with a suspension containing *C. chauvoei* inoculum and the tests were performed at 24h, 48h, 72h, and one week of storage. The sensitivity of the technique was not affected by the use of common filter paper. There were no cross-reactions and no amplifications were observed from the negative control samples. Direct PCR by using common filter paper showed amplification in 50% of the samples at 24 h, 100% at 48h, 70% at 72h, and 90% within one week of storage at room temperature. This method demonstrated to be a practical and economical alternative for collection, storage and material shipment for molecular diagnosis of blackleg. Second experiment aimed to verify the potency of immunization provided by two polyvalent clostridial vaccines (A and B vaccines) tested against the field strain (SBP 07/09) and the reference strain (MT) of *C. chauvoei*. The assays were made through of challenge in immunized guinea pigs, officially used by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brazil) (equivalent to Department of Agriculture) and subsequent evaluation of the humoral response of guinea pigs by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) was done. At the end of the experiment, all vaccinated guinea pigs remained alive and no clinical signs of the disease were observed, while the control group showed characteristic blackleg clinical signs and died within 24 to 48 hours. The vaccines tested were effective in stimulating the humoral response against both field strain SBP 09/07 and the reference strain MT of *C. chauvoei*. All four vaccinated and challenged groups seroconverted by the ELISA after vaccination and the control group remained seronegative. However, animals immunized with B vaccine had higher levels of antibodies detected when compared with guinea pig immunized with A vaccine. This work has important contributions to the prevention and development of diagnostic methods for blackleg, a relevant disease with economic and animal health impact.

Key words: Laboratory diagnosis; potency vaccine; PCR; *Clostridium chauvoei*



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Delineamento amostral: grupos de cobaias conforme a vacina clostridial polivalente utilizada, dose e via de aplicação e a cepa desafio de *C. chauvoei* inoculada após revacinação. .... 49
- Tabela 2 - Resultado do teste de eficiência das vacinas clostridiais polivalentes A e B e os valores médios  $\pm$  desvio padrão da resposta humoral das cobaias expressas em densidade óptica (DO) no teste ELISA dos grupos vacinados com as vacinas A e B e desafiados com a cepa de referência (MT) e a cepa de campo (SBP 07/09) de *C. chauvoei*. .... 50

## LISTA DE REDUÇÕES

**°C** Graus Celsius

**CG** Cromatografia de gases

**cm** Centímetro

**DL<sub>50</sub>** Dose letal em 50%

**DNA** Ácido Desoxirribonucléico

**ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)

**h** Hora

**IFD** Imunofluorescência direta

**IHQ** Imunohistoquímica

**MAPA** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ml** Mililitro

**mm** Milímetro

**mM** Milimolar

**MT** Manguinhos Teixeira

**OD** *Optical density* (Densidade óptica)

**OPD** *o-phenylenediamine*

**PBS** *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada em fosfato)

**PCR** *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**pH** Potencial hidrogeniônico

**s** Segundos

**µl** Microlitro

**UFC** Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Aspectos relevantes da enfermidade .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Diagnóstico .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Imunização .....</b>	<b>21</b>
<b>3 CAPÍTULO 1 Diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático a partir de papel filtro comum .....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>28</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>4 CAPÍTULO 2 Testes de vacinas frente ao desafio com uma cepa de campo de <i>Clostridium chauvoei</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>37</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A criação de bovinos tem extrema importância econômica, social e até mesmo cultural no Brasil, principalmente no sul do país. O rebanho bovino brasileiro em 2009 somou 205 milhões de cabeças, dos quais 14,36 milhões no estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010). Em 2010, a exportação de carne bovina já havia alcançado a marca de 1,5 milhões de toneladas até o mês de novembro (ABIEC, 2011). A carne bovina é um dos principais itens na pauta de exportação do país, além de ser responsável pela geração de empregos em vários setores (BENAVIDES & TRINDADE, 2008).

Entre os fatores que acarretam prejuízos aos estabelecimentos de criação bovina estão as doenças bacterianas, como as clostridioses. As clostridioses formam o grupo de infecções e intoxicações causadas por microrganismos anaeróbios do gênero *Clostridium*. Estes microrganismos são bacilos, gram positivos e têm a habilidade de passar por uma forma de resistência chamada esporo e podem, assim, se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana (TITBALL et al., 2006).

Dentre as clostridioses, a principal doença que determina mionecrose é o carbúnculo sintomático, uma infecção aguda ou superaguda que acomete principalmente os bovinos, cujo agente etiológico é *Clostridium chauvoei* (SONGER, 2010). O carbúnculo sintomático foi reconhecido como doença distinta em 1782 por Chabert, o qual a denominou “carbon symptomatique” (carvão, em francês, para se referir à coloração preta da lesão necrótica que produz) e o distinguiu do carbúnculo hemático, enfermidade com a qual é frequentemente confundido (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

O carbúnculo sintomático ocorre em todo o mundo, com taxas que diferem entre e dentro das áreas geográficas, o que sugere um solo reservatório ou fatores climáticos e sazonais ainda a serem definidos (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004). No entanto, a contaminação é frequentemente endógena. Evidências sugerem que esporos são translocados do intestino para o tecido normal e permanecem dormentes (estado latente) por toda a vida do animal, a não ser que encontrem condições apropriadas para germinação e produção da doença (SONGER, 2010). Os animais jovens (idade inferior a três anos) e com bom estado nutricional são preferencialmente acometidos (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004).

As perdas econômicas ocasionadas pelo carbúnculo sintomático são de difícil mensuração em razão da escassez de dados. Entretanto, devido à sua alta letalidade, estima-se que estes sejam elevados (BALDASSI et al., 1985). Os prejuízos ocasionados pela doença não são quantificados na maioria dos países, mas na Nigéria, as perdas anuais estão estimadas em 4,3 milhões de dólares (USEH et al., 2006).

Por isso, qualquer processo que possa auxiliar na prevenção e no desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais eficazes para doenças infecciosas nesses rebanhos tem crucial importância, tanto do ponto de vista econômico quanto de saúde animal.

O diagnóstico etiológico da mionecrose infecciosa é essencial para a adoção de medidas de controle. Diferente do botulismo, tétano e enterotoxemias, em que a detecção da(s) toxina(s) produzida(s) pelos agentes envolvidos é imprescindível para o diagnóstico, na mionecrose a detecção dos agentes é suficiente para se ter um diagnóstico conclusivo. No entanto, o insucesso no isolamento destes geralmente ocorre pela dificuldade encontrada pelos médicos veterinários em enviar material de forma correta e em tempo hábil ao laboratório, e por este envio ser muitas vezes economicamente inviável ao estabelecimento rural ou pelas grandes distâncias a serem vencidas entre estabelecimento rural e laboratório (BALDASSI et al., 1985).

Já nos laboratórios, o diagnóstico por meio dos métodos tradicionais de isolamento e identificação do agente é complexo, pois *C. chauvoei* necessita de meio especial, ambiente privado de oxigênio e ainda apresenta crescimento fastidioso que pode ser inibido por outros microrganismos que se disseminam após a morte (STERNE & BATTY, 1975). Portanto, um diagnóstico preciso de *C. chauvoei*, apenas por meio de cultivo é frequentemente dificultoso (KUHNER et al., 1997).

O emprego da técnica da PCR (*Polymerase chain reaction*) é capaz de fornecer um diagnóstico mais rápido e preciso. Neste sentido, o desenvolvimento de um método rápido, prático e economicamente viável para armazenamento e remessa de material para diagnóstico laboratorial de carbúnculo sintomático unindo a praticidade, sensibilidade e especificidade da técnica da PCR usada para identificação de *C. chauvoei* é um dos objetivos deste trabalho.

Como o curso da doença é agudo ou superagudo e a letalidade é próxima a 100% (KRIEK & ODENDAAL, 2004), as medidas profiláticas associadas à vacinação são mais importantes do que a terapia antimicrobiana. Quando o diagnóstico está correto, a doença pode ser facilmente controlada no restante do rebanho.

As vacinas clostridiais comercializadas no Brasil são compostas de múltiplos antígenos (múltiplas valências) e as normas para o controle da qualidade e eficiência dessas

vacinas estão definidas na legislação publicada pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1997).

O teste de eficiência para vacinas contendo *C. chauvoei* utiliza o desafio em cobaias imunizadas para liberação de partidas de vacinas em produto pronto para o comércio, este teste é realizado pelo fabricante e por órgãos oficiais e tem uma padronização corrente na legislação vigente em vários países (British Pharmacopoeia 1998, EUA 1991, Brasil 1997)

Acredita-se que um dos motivos pelos quais estas partidas devem ser submetidas ao teste de eficiência seriam diferenças de reatividade sorológica cruzada entre diferentes cepas, pois, segundo Reed & Reynolds (1977), Woolcock & Frost (1978) e Kriek & Odendaal (2004) existem relatos de falhas vacinais acarretando surtos de carbúnculo sintomático em bovinos vacinados, tanto no exterior (Srinivasan & Venugopallan 1997, Corpus et al. 2008, Miranda et al. 2008) quanto no Brasil (Santos 2003, Gregory et al. 2006). Este fato é reforçado pela menção das diferenças no grau de imunogenicidade e virulência das cepas de *C. chauvoei* citadas por autores como Kerry (1967), Chandler & Gulasekharam (1970), Mattar et al. (1999) e Naz et al. (2005).

As diferenças antigênicas de *C. chauvoei* entre a cepa utilizada para o controle oficial de eficiência das vacinas, as cepas utilizadas nas formulações das vacinas e as cepas que ocorrem no campo poderiam ser a causa de falhas vacinais que resultam em surtos de carbúnculo sintomático, relatadas tanto no exterior (REED & REYNOLDS, 1977; CORPUS et al., 2008) quanto no Brasil (GREGORY et al., 2006).

Portanto, os objetivos do trabalho foram avaliar a possibilidade da utilização do papel filtro comum na coleta, armazenamento e remessa de material ao laboratório para diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático e verificar a eficiência de duas vacinas clostridiais polivalentes frente ao desafio com uma cepa isolada de campo de *C. chauvoei*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos relevantes da enfermidade

O carbúnculo sintomático pode acometer os bovinos e outras espécies de animais domésticos e silvestres (ovelhas, cabras e viados), produzindo importantes perdas econômicas (USEH et al., 2006). Esta infecção causa uma doença aguda ou hiperaguda, usualmente fatal que acomete principalmente animais jovens (com menos de três anos de idade) e com alto patamar nutricional (KRIEK & ODENDAAL, 2004). O agente etiológico do carbúnculo sintomático é o *Clostridium chauvoei*, agente etiológico do carbúnculo sintomático, é um bacilo gram positivo, anaeróbico, de 3-8µm de comprimento e 0,5-1µm de largura. As células são móveis e geralmente apresentam flagelos peritríquios, os esporos ocorrem na posição central e subterminal e distorcem a forma da célula (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

Acredita-se que a infecção segue a ingestão de esporos a partir de solo ou água contaminados. A enfermidade pode ocorrer principalmente no período que sucede a erupção dos dentes permanentes dos ruminantes, o que reforça o motivo da doença ocorrer principalmente em animais jovens (KRIEK & ODENDAAL, 2004). Evidências também sugerem que esporos podem ser translocados do intestino para o tecido normal onde permanecem dormentes (estado latente) por toda a vida do animal, a não ser que encontrem condições apropriadas para germinação e produção da doença (SONGER, 2010). A condição adequada para a germinação destes esporos seria um trauma impelido às grandes massas musculares resultando em baixo potencial de oxi-redução com consequente fermentação do glicogênio muscular, digestão de proteínas e produção de exotoxinas e gás (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

Os animais infectados desenvolvem hipertermia, anorexia, depressão, claudicação com lesões crepitantes e morte súbita (SINGER, 2010). As áreas centrais das lesões são frequentemente secas e enfisematosas, mas as áreas periféricas são edematosas, hemorrágicas e necróticas (SINGER, 2010).



## 2.2 Diagnóstico

Entre as doenças bacterianas as clostridioses são as mais preocupantes aos estabelecimentos pecuários, devido às perdas econômicas que determinam (BALDASSI et al., 1985; USEH et al., 2006). Dentre elas, o carbúnculo sintomático, cujo agente etiológico é *Clostridium chauvoei*, produz uma miosite necrosante enfisematosa fatal para os bovinos (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004).

Apesar do grande número de casos relatados, a maioria dos diagnósticos de carbúnculo sintomático não é confirmada em laboratório e é realizada apenas com base nos achados clínicos e de necropsia (ASSIS et al. 2001).

Alguns estudos, fundamentados na identificação do agente em laboratório apontam a ocorrência desta enfermidade no Brasil. No laboratório de bacteriologia animal do instituto biológico no Estado de São Paulo, das 2.082 amostras suspeitas de clostridiose enviadas entre os anos de 1970 e 1979, 163 foram diagnosticadas como carbúnculo sintomático por meio do isolamento de *C. chauvoei* (BALDASSI et al., 1985). Em um estudo retrospectivo realizado em 30 casos suspeitos de carbúnculo sintomático e edema maligno isolou-se *C. chauvoei* em 70% das amostras (ASSIS et al., 2010). Outra pesquisa realizada com amostras suspeitas de clostridiose providas de municípios do Rio Grande do Sul entre os anos de 1988 e 2007 demonstrou o isolamento individual de *C. chauvoei* em 25 amostras, correspondendo a 26% dos casos de clostridioses neste período (MABONI et al., 2010).

Métodos convencionais para detecção dos agentes etiológicos das amostras clínicas de mionecroses são fundamentados nas técnicas de cultivo, isolamento e avaliação das características morfológicas e bioquímicas dos clostrídios (BALDASSI et al., 1985; PETERSON et al., 1996). Para isto devem ser enviados ao laboratório amostras de órgão e tecidos do animal necropsiado com suspeita da doença. Geralmente, porção do músculo ou útero afetado, medula óssea, porção do fígado, e impressão destes tecidos em lâmina (STERNE & BATTY, 1975). Para evitar a contaminação por outros microrganismos que se disseminam após a morte (STERNE & BATTY, 1975; BALDASSI et al., 1985) as amostras devem ser coletadas de forma asséptica, armazenadas em recipiente estéril e submetidas a refrigeração até a chegada ao laboratório (KRIEK & ODENDAAL, 2004). Entretanto o diagnóstico laboratorial deve sempre levar em conta os sinais clínicos e achados de necropsia, já que o *C. chauvoei* pode ser encontrado em órgãos de animais sadios (KERRY, 1964).

Como o curso do carbúnculo sintomático é muito rápido, geralmente menos de 24 horas, sinais clínicos não são frequentemente observados em animais afetados antes da morte. Caso consiga-se inspecionar o animal antes da morte, poderá ser verificada acentuada claudicação com acentuada tumefação da parte superior do membro acometido, sendo que nos estágios iniciais a tumefação é quente e dolorosa a palpação, após se torna fria e indolor. Se os músculos afetados são superficiais existe tumefação subcutânea e crepitação local (RADOSTITIS et al., 2002; KRIEK & ODENDAAL, 2004). Em um exame mais minucioso poderá ser observada depressão grave, anorexia absoluta, estase ruminal, hipertermia e frequência do pulso elevada.

Os procedimentos de cultivo e isolamento de agentes da mionecrose são bastante laboriosos, demorados e requerem pessoal treinado e podem incorrer em resultados imprecisos (ASSIS et al., 2001; KOJIMA et al., 2001). Pois, *C. chauvoei* é um anaeróbio de crescimento tardio e necessita de meios de cultivo especiais e ambiente privado de oxigênio, além da possível contaminação por outros microrganismos. Portanto, um diagnóstico preciso de *C. chauvoei*, apenas por meio de cultivo é difícil (KUHNERT et al., 1997).

Por não possuir as enzimas superóxido dismutase e catalase, *C. chauvoei* requer ambiente estritamente anaeróbio, contendo aproximadamente 10% de dióxido de carbono (QUINN et al., 1994). Meio de cultivo rico em cisteína e vitaminas solúveis (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004), sendo que a cisteína pode ser substituída por tioglicolato de sódio ou mesmo por pedaços de fígado e músculo, com o objetivo de diminuir o potencial de oxido-redução do meio de cultura (BISPING & ARMSTRONG, 1988). Muitas vezes *C. chauvoei* tem que ser isolado a partir de material contaminado e em tais casos tem sido sugerido o aquecimento do meio de cultura após a sementeira ou a incorporação de agentes seletivos tais como neomicina, canamicina, polimixina, cristal violeta ou sulfadiazina aos meios de cultura (BISPING & AMTSBERG, 1988).

A identificação deste microrganismo pode ser facilitada pelo cultivo em ágar enriquecido com sangue ovino, pois resulta em colônias circundadas por ampla hemólise. Este processo também produz esporos subterminais juntamente com numerosas formas pleomórficas vistas ao microscópio por meio da coloração de Gram (WALKER, 1990).

*C. chauvoei* é facilmente confundido com outras espécies do gênero *Clostridium*, principalmente com *C. septicum* em razão da similaridade dos caracteres morfológicos e bioquímicos (STERNE & BATTY, 1975). A semelhança da constituição antigênica dos dois organismos tem sido apontada por pesquisadores que chegam a afirmar que os dois organismos possam ser membros de uma espécie comum (BARNES et al., 1975a;

HAMAOKA & TERAOKA, 1994). Ainda, em meio sólido, *C. septicum* apresenta um crescimento rápido, sobrepujando o crescimento do *C. chauvoei* (KUHNERT et al., 1997).

Para tanto, existem propriedades bioquímicas pelas quais estas duas espécies podem ser diferenciadas. Dentre estas propriedades está a fermentação de carboidratos. A fermentação da sacarose é uma característica diferencial amplamente aceita, pois é positiva para *C. chauvoei* e negativa para *C. septicum* (BISPING & AMTSBERG, 1988; MAC FADDIN, 1980), no entanto, alguns pesquisadores não consideram esta diferença real (HATHEWAY, 1990). A fermentação da salicina também pode ser utilizada para diferenciar estas espécies, enquanto *C. chauvoei* raramente fermenta, *C. septicum* fermenta frequentemente (BISPING & AMTSBERG, 1988; MAC FADDIN, 1980). Outro teste bioquímico que pode diferenciar estas duas espécies é a reação metabólica em meio contendo leite (*litmus milk test*), enquanto o *C. chauvoei* se mantém inerte neste teste, o *C. septicum* precipita a caseína resultando em um coágulo gelatinoso e firme (MAC FADDIN, 1980). No entanto, autores alegam que a padronização dos resultados de testes bioquímicos de espécies clostridiais são representados apenas por uma única cepa. Por este motivo, a identificação com base nestes métodos pode ser inexata pelas variações intraespecíficas naturais que ocorrem em processos metabólicos entre várias cepas de uma mesma espécie (GROSSE-HERRENTHEY et al., 2008).

Além das semelhanças na morfologia em meio sólido e nos resultados de testes bioquímicos, *C. chauvoei* e *C. septicum* também apresentam padrões muito similares nas análises de cromatografia de gases (CG) de ácidos graxos voláteis não permitindo uma diferenciação exata entre as espécies (GONZÁLEZ & ROTH, 1999).

Alguns métodos imunológicos de diagnóstico podem ser empregados para visualizar e individualizar a bactéria, como a imunofluorescência direta (IFD), teste de referência para mionecroses, que permite a detecção dos agentes por meio de anticorpos marcados. Podem ser realizados em esfregaços de cultivo (BATTY & WALKER, 1963; PINTO & ABREU, 1992; ASSIS et al., 2001), em impressões (*claps*) obtidas diretamente dos tecidos durante a necropsia (ASSIS et al., 2005a) e por meio da imunohistoquímica (IHQ) em tecidos fixados em formol ou incluídos em blocos de parafina (CONESA et al., 1995; ASSIS et al., 2007, ASSIS et al., 2010).

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*, e segundo alguns autores tem a vantagem de não propiciar reação cruzada (BISPING & AMTSBERG, 1988; QUINN et al., 1994). As

impressões de tecido, uma vez secas, podem ser enviadas ao laboratório sem a necessidade de condições especiais de transporte, conservando-se inalterada por vários dias a temperatura ambiente (ASSIS et al., 2001). No entanto, a técnica tem algumas limitações, dentre as quais as associadas com as características do corante de fluoresceína, pois os anticorpos fluoresceínados apenas podem ser vistos com auxílio de equipamentos caros e o corante desaparece rapidamente (HAINES & CLARK, 1991). Já a técnica de imunohistoquímica que é baseada na coloração por enzimas de tecidos fixados com formalina tem vantagens sobre outros métodos diagnósticos pela conveniente apresentação da amostra e por permitir diagnóstico retrospectivo, porém é mais laboriosa que a IFD por exigir a etapa de fixação do tecido (HAINES & CLARK, 1991).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) está livre da maioria dos problemas mencionados acima (KUHNERT et al., 1997; KOJIMA et al., 2001). A identificação do *C. chauvoei* pela PCR demonstra um resultado superior quando comparado aos testes sorológicos como a imunofluorescência (KUHNERT et al., 1997).

Os primeiros trabalhos envolvendo estudos de biologia molecular começaram com a amplificação de sequências conservadas como da subunidade 16S rRNA (KUHNERT et al., 1997), da subunidade 16S-23S rDNA (SASAKI et al., 2000; SASAKI et al., 2001) aliadas a emprego de enzimas de restrição na técnica. Mais tarde, pesquisadores japoneses começaram a usar iniciadores para sequência gênica que codifica a proteína flagelar (flagelina) de *C. chauvoei*, o que permitiu realizar a técnica sem a necessidade do uso de enzimas de restrição (KOJIMA et al., 2001). Isto abriu caminho para o uso de PCR *multiplex* no diagnóstico laboratorial de mionecroses, primeiro com sequências gênicas que codificam a flagelina de várias espécies do gênero *Clostridium* (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* tipos A e B e *C. haemolyticum*) (SASAKI et al., 2002). Pesquisadores brasileiros também desenvolveram uma PCR *multiplex* com iniciadores para o gene da flagelina de *C. chauvoei* e da alfa-toxina de *C. septicum* com o objetivo de diferenciar essas espécies (ASSIS et al., 2008).

A importância da técnica de PCR *multiplex* é devida à rapidez e precisão na diferenciação destes microrganismos, além da utilização de diferentes sequências iniciadoras em uma mesma reação, o que reduz os custos do teste, já que *C. chauvoei* e *C. septicum* ocorrem em quadros semelhantes de mionecrose e são de difícil distinção (ASSIS et al., 2008).

Estudos desenvolvendo métodos de PCR *multiplex* em tempo real para rápida identificação de *C. chauvoei* também estão sendo aprimorados. Neste sentido, pode-se citar trabalhos baseados na detecção do gene *spo0A* que codifica o fator-chave envolvido no início

da esporulação e desenhado de forma a diferenciar *C. chauvoei* e *C. septicum* (LANGE et al., 2010) e outro desenvolvido com a sequência do gene 16S rDNA com a inclusão de marcadores de amplificação interna que também se destinam a diferenciar *C. chauvoei* de *C. septicum* (HALM et al., 2010).

No entanto, uma desvantagem da técnica da PCR é que a presença do gene não é invariavelmente indicativa da presença da doença (GROSSE-HERRENTHEY et al., 2008) o que se torna acentuado pela sensibilidade cada vez maior da técnica, podendo detectar até um picograma de DNA (LANGE et al., 2010). Já que até mesmo achados ocasionais de organismos em órgãos parenquimatosos mostrando marcada decomposição devem ser interpretados cautelosamente porque pode ocorrer invasão tardia do cadáver a partir do trato intestinal e solo (STERNE & BATTY, 1975), ainda, existem indicativos de que animais saudáveis tenham o *C. chauvoei* em órgão como o baço e fígado (KERRY, 1964).

Pesquisas indicam o MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry*) como uma ferramenta eficaz para a identificação rápida e confiável de clostrídios, pois a tecnologia empregada baseia-se em um banco de dados de referência de alta qualidade que pode ser útil para distinguir *C. chauvoei* de *C. septicum* (GROSSE-HERRENTHEY et al., 2008). No entanto, a aplicação desta técnica é limitada por necessitar da cultura pura da bactéria o que requer consumo de tempo neste passo (LANGE et al., 2010) e também pelo elevado custo de execução da técnica..

O diagnóstico por meio de microarranjo também foi desenvolvido para espécies patogênicas de *Clostridium*, discriminando até quatro espécies em uma amostra (JANVILISRI et al., 2010). Contudo, o emprego desta técnica somente é viável em vasta rotina laboratorial.

Nota-se que muitas ferramentas são desenvolvidas para facilitar a identificação bacteriológica nos laboratórios, principalmente em se tratando de clostrídios causadores de mionecroses. No entanto, métodos para facilitar o envio de amostras do campo ao laboratório também precisam ser pesquisados e aperfeiçoados.

A coleção de sangue seco e tecidos impregnados em papel filtro é uma grande inovação para facilitar o desenvolvimento e disseminação de programas de triagem e diagnóstico de doenças, principalmente pela facilidade de coleta da amostra, manipulação e envio da amostra ao laboratório, além da estabilidade do analisado neste espécime (McCABE, 1991). Logo, a extração de DNA de amostras de sangue seco ou tecidos impregnados em papel filtro comum representam facilidade na coleta e transporte da amostra para o laboratório e diagnóstico por meio da detecção de fragmentos específicos no DNA extraído. Neste

sentido, o desenvolvimento de um método prático e economicamente viável para armazenamento e envio de material para diagnóstico ao laboratório aliado à rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica da PCR usada para *C. chauvoei* trará uma importante contribuição para o diagnóstico e também para a investigação dessa enfermidade.

### 2.3 Imunização

A erradicação das clostridioses é uma ação impraticável devido à característica inerente aos seus agentes etiológicos de formar esporos e assim permanecerem por longos períodos no ambiente ou no trato digestivo de animais saudáveis (SONGER, 2010). No caso do carbúnculo sintomático, soma-se a isto o caráter agudo da doença e o insucesso de terapias antimicrobianas (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004).

Surtos da doença são relatados em várias partes do mundo, tanto na sua forma clássica, de ocorrência mais freqüente e que afeta a musculatura esquelética (RIET-CORREA, 2007), quanto na sua forma visceral, na qual pode acometer miocárdio, diafragma (MALONE et al., 1986; UZAL et al., 2003) e, em casos mais raros, língua e intestino delgado (HARWOOD et al., 2007).

As lesões no miocárdio ocorrem 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). Contudo, a forma clássica da doença é uma consequência da ativação de esporos de *C. chauvoei* latentes na musculatura dos animais (KRIEK & ODENDAAL, 2004).

Embora o carbúnculo sintomático seja mundialmente distribuído, existem locais onde os surtos da doença são mais prevalentes, como na Nigéria (USEH et al., 2010) e Bangladeche (SULTANA et al., 2008). Também no Brasil alguns surtos da doença são descritos (ASSIS et al., 2005b; GREGORY et al., 2006). No entanto supõe-se que a prevalência do carbúnculo sintomático seja subestimada, pois em alguns casos não são manifestados os sinais clínicos clássicos da enfermidade (HIGGINSON, 1940), em outros tantos o animal é encontrado em estado avançado de decomposição *post-mortem* (RADOSTITS et al., 2002), impossibilitando a remessa de material ao laboratório. Estes fatores contribuem com a dificuldade de se distinguir o carbúnculo sintomático de outras doenças infecciosas agudas ou superagudas

como o anthrax e o edema maligno e também com outras causas de morte súbita como a queda de raios e acidentes ofídicos (RADOSTITS et al., 2002; KRIEK & ODENDAAL, 2004). Estes obstáculos podem resultar em diagnósticos falhos e recomendações impróprias de controle (RADOSTITS et al., 2002).

Eventos naturais e mecânicos são apontados como fonte potencial do aparecimento do carbúnculo sintomático, pois podem expor e reativar esporos latentes. Dentre os fatores naturais estão os períodos de precipitação pluvial (BAGADI, 1978), nos mecânicos, a escavação de solos (BARNES et al., 1975b).

A vacinação é a estratégia mais confiável para a prevenção desta infecção (KRIEK & ODENDAAL, 2004), a qual é endêmica na África, Estados Unidos, América do Sul e Central, Ásia e Europa (USEH et al., 2006). O controle e profilaxia devem basear-se em medidas adequadas de manejo e vacinações sistemáticas de todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com o agente e com os fatores que poderão desencadear a doença (LOBATO et al., 2007).

Os principais antígenos deste microrganismo podem ser divididos em dois grupos distintos: antígenos celulares e antígenos solúveis. Por sua vez, os antígenos celulares podem ser subdivididos em antígenos somáticos e antígenos flagelares. Porém, esta bactéria tem uma antigenicidade multifacetada, pois além do antígeno somático (O) termoestável comum a todas as cepas e do antígeno flagelar (F) termolábil, também existem exotoxinas letais e enzimas, todas antigênicas, mas com imunogenicidade variável (LE MINOR & VÉRON, 1989).

Em trabalhos da década de 70, a imunidade protetora contra *C. chauvoei* era considerada como sendo estimulada principalmente por antígenos somáticos termo-estáveis do organismo, ou seja, os imunógenos estariam alocados na parede celular da bactéria (CHANDLER & HAMILTON, 1975; CHANDLER, 1975). Estes pesquisadores afirmaram categoricamente que células sem flagelo produziram altos níveis de imunidade protetora em cobaias, enquanto a suspensão flagelar não mostrou a mesma proteção (CHANDLER & GULASEKHARAM, 1974).

No entanto, pesquisadores Argentinos defendem, em uma série de estudos, a imunogenicidade flagelar como sendo tão importante para montar uma resposta imune quanto à somática (MICALIZZI & GUZMÁN, 1997; DI GENARO et al., 1999; MATTAR et al., 1999). Nestes estudos comparam a resposta estimulada por diferentes preparações antigênicas, resultando em 100% de proteção aos animais testados com o extrato celular e as células tratadas com formol, enquanto 75% dos animais foram protegidos somente com a

suspensão flagelar demonstrando que esta contribui em parte na imunogenicidade da cepa (MICALIZZI & GUZMAN, 1997).

Pesquisadores japoneses avaliam a proteína flagelar de *C. chauvoei* como principal antígeno imunogênico e como um fator de virulência (TAMURA et al., 1995; KIJIMA-TANAKA et al., 1994a; KOJIMA et al., 1999). O monômero da flagelina, proteína flagelar de *C. chauvoei*, tem massa molecular de 56 kDa, e suas formas poliméricas variam entre 120 e 200 kDa. Sendo que os principais peptídeos desta proteína apresentam massa molecular de 33, 20 e 6 kDa (TAMURA et al., 1992).

Estudos mostram que o flagelo purificado deste anaeróbico ou o anticorpo anti-idiopático são protetores em camundongo (TAMURA et al., 1984; KIJIMA-TANAKA, 1994b; KOJIMA et al., 1999). É assinalado também que a imunogenicidade nos mutantes não flagelados é 100 vezes menor em comparação com as cepas flageladas (TAMURA et al., 1984; TAMURA et al., 1995) e que o soro anti-flagelar tem uma importante função na proteção passiva (TAMURA et al., 1984).

Os epítomos da flagelina que participam da proteção são espécie-específicos e estão expostos na superfície do filamento flagelar (TANAKA et al. 1987; TAMURA et al., 1992), diferentes de epítomos não-protetores que exercem reação cruzada e não estão expostos na superfície, o que implica dizer que, neste caso, os epítomos não-protetores da flagelina carregam sequências primárias conservadas entre as várias espécies de clostrídios (TAMURA et al., 1992). Em outro estudo, a comparação da sequência de 413 aminoácidos da flagelina de *C. chauvoei* com a de outras bactérias mostra considerável homologia nos domínios N-terminal e C-terminal (KOJIMA et al., 2000). Esta pesquisa também sugere que o epítopo flagelar depende da conformação para exercer uma importante função no desenvolvimento de imunidade contra o carbúnculo sintomático (KOJIMA et al., 2000).

Pelo fato da imunidade para *C. chauvoei* ser considerada principalmente contra antígenos celulares, informações sobre a imunogenicidade de proteínas extracelulares são escassas. No entanto, este microrganismo possui um mecanismo de infecção invasiva assistida por toxinas com atividade local e extracelular que espalham fatores de proteção, cuja imunogenicidade tem sido pouco estudada (MATTAR et al., 1999).

Resultados obtidos em testes de imunização com proteínas extracelulares de cepas de campo e de referência indicam que a contribuição destas na imunidade protetora é de grande importância (MATTAR et al., 1999), induzindo uma forte resposta imunoprotetora, mesmo em baixas doses (MATTAR et al., 2007).



Este microrganismo produz pelo menos cinco antígenos solúveis incluindo uma hemolisina oxigênio-estável (alfa-toxina) tida como hemolítica, necrotizante e letal, uma deoxirribonuclease (beta-toxina), uma hialuronidase (gama-toxina), uma hemolisina oxigênio-lábil (delta-toxina) e uma neuraminidase. O tipo e quantidade destes componentes extracelulares variam, dentre outras coisas, com a cepa do organismo, o meio de cultura e com o período de incubação (MOUSSA, 1958; CORTIÑAS et al., 1999).

A toxina alfa é a principal proteína envolvida nos quadros patológicos das mionecroses, devido às suas atividades biológicas. O seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na formação de poros e lise osmótica, exibindo uma liberação pré-lítica de íons potássio (HATHEWAY, 1990). Sugere-se que a enzima neuraminidase poderia ter a função de facilitar a difusão da doença no tecido infectado de ruminantes por meio da clivagem ácido siálico (USEH et al., 2004)

A resposta imunoprotetora estimulada pelos antígenos imunogênicos de *C. chauvoei*, tanto celulares quanto extracelulares, é mediada principalmente por anticorpos, e a imunidade celular tem pouca contribuição para a proteção (MATTAR et al., 1999). Especula-se que *C. chauvoei*, após opsonizado, seja eliminado principalmente por leucócitos polimorfonucleares (TAMURA et al., 1984).

Apesar de todas as pesquisas sobre antígenos imunogênicos de *C. chauvoei* visando bacterinas recombinantes mais seguras (TAMURA et al., 1992; MBENG, 2008; CORPUS et al., 2008). As vacinas comerciais ainda trazem na sua formulação a célula inteira inativada em formalina. As vacinas comercializadas no Brasil são compostas de múltiplos antígenos e as normas para o controle da qualidade e eficiência dessas vacinas estão definidas na legislação publicada pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA (BRASIL, 1997). Entretanto, apenas as vacinas contra *C. chauvoei*, *C. botulinum* e algumas toxinas do *C. perfringens* são submetidas ao controle oficial pelo MAPA. Os demais antígenos de clostrídios (valências que compõem a vacina clostridial) passam por controle obrigatório, porém, realizado somente pelos próprios fabricantes.

O regulamento utiliza critérios da Farmacopéia Européia (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1998) e do Código Federal de Regulamentações dos Estados Unidos da América (EUA, 1991). No Brasil, a cepa utilizada como desafio no teste de eficiência Oficial é intitulada cepa MT (Manguinhos-Teixeira) e foi isolada neste país e desde então é mantida em laboratório.

Produtos biológicos, como as vacinas, requerem o controle de qualidade de cada etapa da fabricação e de cada partida para certificar a segurança e a eficiência do produto comercial. Parte do controle de qualidade é fundamentado em modelo animal, inclusive o empregado no Brasil. A cobaia (*Cavia porcellus*) é validada como modelo de laboratório para testar vacinas que contenham o antígeno de *C. chauvoei*, tanto para bovinos (MACHEAK et al., 1972), quanto para ovinos (CRICHTON et al., 1986).

A fim de ter a máxima proteção a partir de vacinas para carbúnculo sintomático é importante que as cepas de *C. chauvoei* utilizadas para produção de vacinas sejam sorologicamente e imunologicamente homólogas as cepas locais prevalentes no campo (REED & REYNOLDS, 1977; MATTAR et al., 1999). E as cepas utilizadas nos testes oficiais de eficiência das vacinas para carbúnculo sintomático devem apresentar elevado grau de virulência para realmente serem efetivas em desafiar a proteção estimulada pelas cepas vacinais (CHANDLER, 1976).

As diferenças no grau de imunogenicidade e virulência das cepas de *C. chauvoei* são reportadas em vários estudos (KERRY, 1967; CHANDLER & GULASEKHARAM, 1970; MATTAR et al., 1999; NAZ et al., 2005) e as diversidades genéticas também são apontadas (SATHISH & SWAMINATHAN, 2009). Estas diferenças antigênicas entre as cepas de *C. chauvoei* que ocorrem no campo e as utilizadas nas formulações das bacterinas poderiam ser a causa de falhas vacinais, relatadas tanto no exterior (REED & REYNOLDS, 1977; SRINIVASAN & VENUGOPALLAN, 1997; CORPUS et al., 2008) quanto no Brasil (GREGORY et al., 2006), por este motivo vários países preconizam o controle oficial desta vacina.

Entretanto, a cepa utilizada como desafio no teste de eficiência das vacinas comercializadas no Brasil foi selecionada sem levar em conta o seu desempenho para este fim, diferentemente de outras cepas, como as intituladas CH3 e CH4, as quais mostraram maior grau de imunogenicidade e virulência quando comparadas a outras cepas (KERRY, 1967; CHANDLER & GULASEKHARAM, 1970; CHANDLER, 1976) e por esta razão foram escolhidas como cepa desafio em outros países como Austrália. Trabalho realizado com vacinas comercializadas no Brasil constatou que a maioria destas (63,6%) não protegem de forma eficiente os animais utilizados no teste de eficiência quando estes foram desafiados com uma cepa de *C. chauvoei* de campo em comparação ao desafio com a cepa de referência MT (SANTOS, 2003). Devido as deficiências atribuídas as vacinas convencionais para carbúnculo sintomático como a falta de especificidade, pesquisas estão voltadas para

identificação de proteínas altamente imunogênicas (TAMURA et al., 1992; MBENG, 2008) para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (CORPUS et al., 2008).

Outros fatores também são importantes para evitar a manifestação do carbúnculo sintomático, como a adoção de um calendário adequado de vacinação, o que abrange também cuidados no transporte, armazenamento e aplicação da vacina. O conhecimento sobre imunidade passiva que inclui a adoção de vacinação das matrizes no período próximo ao parto (TROXEL et al., 1997), assim como, o estabelecimento da idade ideal para a primeira dose da vacina dos bezerros que deve ocorrer por volta dos quatro meses de idade (SCHIPPER et al., 1978). A chamada dose reforço tem extrema importância para o estímulo de uma boa imunidade (TROXEL et al., 1997; ARAUJO et al., 2010).

Levando-se em consideração a probabilidade de falhas vacinais serem causadas por diferenças antigênicas de *C. chauvoei* entre a cepa utilizada para o controle oficial de eficiência das vacinas, as cepas utilizadas nas formulações das vacinas e as cepas que ocorrem no campo, outro objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de duas vacinas clostridiais polivalentes frente a uma cepa de campo de *C. chauvoei*.

## **3 CAPÍTULO 1**

**Diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático a partir de papel filtro comum**

**Luana D'Avila Farias, Agueda Castagna de Vargas**

(Nota a ser submetida para publicação - Ciência Rural)

## Diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático a partir de papel filtro comum

### Molecular diagnosis of blackleg from common filter paper

Luana d'Avila Farias<sup>I\*</sup> Agueda Castagna de Vargas<sup>II</sup>

#### -NOTA-

#### RESUMO

A ausência de diagnóstico conclusivo do carbúnculo sintomático geralmente ocorre por inviabilidade prática e econômica do envio de amostra para diagnóstico ao laboratório. Visando facilitar a coleta, armazenamento e transporte de material ao laboratório, o objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade de amostras com *Clostridium chauvoei* em papel filtro comum para posterior identificação molecular por PCR (*Polymerase chain reaction*) direta. Foram realizados experimentos *in vitro* para estabelecer a sensibilidade, especificidade e viabilidade do método em decorrência do tempo a temperatura ambiente. Para o teste de viabilidade, o papel filtro comum foi impregnado com tecido hepático bovino e *C. chauvoei*. Os testes foram realizados nos períodos de 24h, 48h, 72h e uma semana após impregnação do papel filtro armazenado à temperatura ambiente. A sensibilidade da técnica não foi comprometida com o uso do papel filtro comum. Não foram observadas reações cruzadas e amplificações, a partir das amostras controle negativas. A PCR direta do papel filtro comum apresentou amplificação em 50% das amostras nas 24h, 100% nas 48h, 70% nas 72h e 90% no período de uma semana de armazenamento sob temperatura ambiente. Desta forma, o papel filtro comum pode ser usado como alternativa prática e econômica para coleta, armazenamento e remessa de material para diagnóstico molecular de carbúnculo sintomático.

---

<sup>I</sup> Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS, 97105900, Santa Maria, RS, Brasil. Email [luanavett@gmail.com](mailto:luanavett@gmail.com). Autor para correspondência.

<sup>II</sup> Médico Veterinário, professor associado do Departamento de Medicina veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

**Palavras-chave:** *Clostridium chauvoei*, PCR, armazenamento, clostridioses.

#### **ABSTRACT**

Absence of conclusive diagnosis of blackleg usually happens for practical and economical infeasibility of sending sample to laboratory diagnosis. Seeking to facilitate the collection, storage and material shipment to the laboratory, the aim of this work was to verify the viability of *Clostridium chauvoei* in common filter paper for subsequent molecular identification by using PCR (Polymerase chain reaction). It was tested *in vitro* the sensitivity, specificity and feasibility of this method over different storage periods at room temperature. For the viability test, it was used twelve bovine liver tissues which ten samples were impregnated with suspension containing *C. chauvoei* inoculums and the tests were performed at 24h, 48h, 72h, and one week after impregnation on common filter paper. The sensitivity of the PCR was not affected with the use of common filter paper. There were no cross-reaction and no amplification from the negative control samples. Direct PCR by using common filter paper showed amplification in 50% of the samples in 24 hours, 100% in 48h, 70% in 72h and 90% within one week of storage at room temperature. Therefore, the common filter paper can be used as practical and economical alternative for collection, storage and material shipment for molecular diagnosis of blackleg.

**Key words:** *Clostridium chauvoei*, PCR, storage, clostridiosis.

O carbúnculo sintomático é uma infecção aguda e geralmente fatal cujo agente etiológico é *Clostridium chauvoei* (SONGER, 2010). Acomete principalmente os bovinos e ocasiona elevadas perdas econômicas (USEH et al., 2006).

O diagnóstico etiológico da mionecrose infecciosa é essencial para a adoção de medidas de controle. Porém, a maioria dos diagnósticos é baseada apenas em achados clínicos

e de necropsia (ASSIS et al., 2001) devido à insuficiente praticidade e inviabilidade econômica da remessa do material ao laboratório (McCABE, 1991).

Com o advento da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) tornou-se possível aos laboratórios fornecer um diagnóstico mais rápido e preciso por meio da análise do DNA. A extração de DNA dos microrganismos infectantes a partir de papel filtro impregnado com sangue ou tecido facilita a remessa de amostra ao laboratório, sendo a viabilidade do material neste meio uma grande inovação no diagnóstico de doenças (McCABE, 1991). Neste sentido, buscou-se verificar a possibilidade de utilização do papel filtro comum como método prático e economicamente viável para coleta, armazenamento e remessa de material ao laboratório para diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático.

Para testar a sensibilidade e especificidade da técnica da PCR para o diagnóstico de carbúnculo sintomático em papel filtro comum (Melita®), pequenos pedaços recortado em círculos com área de  $3,14\text{cm}^2$  foram impregnados com uma suspensão de *C. chauvoei* (ATCC 10092) a qual foi quantificada em  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  por meio da contagem em placa. A partir desta suspensão seguiram-se diluições seriadas de  $10^0$  até  $10^{-4}$ , sendo pipetadas  $50\mu\text{L}$  em papel filtro comum. Para controle de possíveis inibidores da PCR presentes no papel filtro,  $50\mu\text{L}$  de cada suspensão também foram dispensadas e armazenadas em microtubos. Quanto à especificidade o mesmo procedimento foi realizado utilizando-se somente a suspensão ( $10^0$ ) de microrganismos de diagnósticos diferenciais: *Clostridium perfringens* (MABONI et al., 2008.), *Clostridium septicum* (ATCC 8065), *Bacillus anthracis* (cepa Stern); além de microrganismos ambientais passíveis de contaminação da amostra: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

A extração de DNA do papel filtro impregnado e seus respectivos controles seguiram o método usado por TAKEUCHI et al. (1997) e feitas em triplicata, sendo testadas em diferentes tempos de armazenamento (0h, 24h, 72 horas e uma semana). Para a extração,

primeiro as células bacterianas foram incubadas por 1 hora à 37°C em 1mL de TES tamponado (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl) contendo 25% de sacarose e acrescido de 3mg ml<sup>-1</sup> de lisozima e incubadas 10 minutos na mesma temperatura com 100µL da solução SDS à 10%. Em seguida, o ácido nucléico foi extraído com fenol-clorofórmio tamponado e somente clorofórmio. A precipitação foi realizada com isopropanol (*overnight*) e etanol 70%. Após secagem, o *pellet* foi ressuscitado em água milliQ. A identificação molecular de *C. chauvoei* foi realizada por meio da PCR com a amplificação parcial do gene (*fliC*) que codifica a flagelina (FliC) de acordo com KOJIMA et al. (2001) e SASAKI et al. (2002). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 2,5µL do tampão 10X (100mM Tris-HCl -pH 8,5, 500mM KCl), MgCl<sub>2</sub> na concentração de 5mM, 40 pmoles de cada iniciador (SASAKI et al., 2002), 0,6 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig®), 5µL de DNA molde (~50ng) e água ultra pura q.s.p.. A amplificação foi realizada utilizando-se 30 ciclos de 1 min à 94°C para desnaturação, 1 min à 57°C para anelamento e 1 min a 72°C para extensão, Os produtos amplificados foram separados por eletroforese e visualizados em gel de agarose à 1,2% corado de brometo de etídio (0,5µg mL<sup>-1</sup>).

Para o teste de viabilidade do DNA em tecido hepático bovino impregnado no papel filtro em diferentes tempos de armazenamento, foram utilizados 12 fígados bovinos, coletados em tubo tipo Falcon estéril diretamente de animais abatidos em frigorífico com inspeção federal. Os tecidos hepáticos de dez animais foram impregnados em papel filtro comuns e acrescidos de 50µL de suspensão contendo 10<sup>4</sup> UFC de *C. chauvoei* em cada papel filtro. Os demais tecidos hepáticos sem adição da suspensão impregnados em papel filtro representaram os controles negativos.

Seguiu-se o protocolo adaptado de SCHWARTZ et al. (1990) a fim de amplificar os produtos por PCR diretamente do papel filtro comum impregnado com o tecido hepático



bovino após a sua fixação com metanol, sem a extração prévia de DNA. Cada papel filtro comum foi armazenado durante os períodos de 24h, 48h, 72h e uma semana. Porções padronizadas com área de  $3,14\text{mm}^2$  com o equivalente a  $10^3$  UFC foram retiradas da amostra utilizando-se Harris Uni-core™ (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). As porções foram colocadas em microtubos estéreis de 0,2mL, encobertas por  $5\mu\text{L}$  de metanol absoluto e secas em temperatura ambiente. Ao microtubo contendo a amostra foram adicionados todos os componentes da PCR com exceção da *Taq* polimerase. Foram aquecidos à  $95^\circ\text{C}$  por 10 minutos, após a Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) foi adicionada em cada microtubo, iniciando, então, a reação de PCR. Os componentes e o volume final da PCR foram os mesmos já descritos, mudando apenas para uma DNA polimerase de alta fidelidade. Já na amplificação, utilizou-se 35 ciclos de 30 s a  $94^\circ\text{C}$  para desnaturação, 30 s a  $57^\circ\text{C}$  para anelamento e 1 min a  $72^\circ\text{C}$  para extensão. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese e visualizados em gel de agarose à 1,2% corado com brometo de etídio ( $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Com este trabalho foi possível demonstrar o potencial uso do papel filtro comum para coleta, armazenamento e remessa de amostras contendo *C. chauvoei* mantidas à temperatura ambiente para posterior diagnóstico do carbúnculo sintomático em laboratório. O DNA extraído do papel filtro comum impregnado com a bactéria utilizado neste trabalho não inibiu a PCR e, portanto, não comprometeu a sensibilidade da técnica. A quantidade de DNA amplificada foi suficiente para ser visualizada na altura de 535pb em gel de agarose corado com brometo de etídio (SASAKI et al., 2002). Na maioria dos casos foi possível visualizar a amplificação até a diluição equivalente a 100 UFCs, aproximando-se dos resultados obtidos por KOJIMA et al. (2001) que encontraram até 200 UFCs pelo PCR. A especificidade da técnica foi mantida mesmo com o acréscimo do papel filtro comum, não havendo reação

cruzada com nenhum dos microrganismos testados, confirmando a especificidade do gene anteriormente estudado por KOJIMA et al. (2001) e SASAKI et al. (2002).

Os resultados obtidos com a PCR direta a partir do uso do papel filtro impregnado com tecido hepático e *C. chauvoei*, mostraram-se promissores, sendo possível visualizar ampliações em 50% das amostras nas 24h, 100% nas 48h, 70% nas 72h, 90% no período de uma semana. Segundo McCABE (1991) e BU et al. (2008) a técnica da PCR direta apresenta vantagens por que elimina a extração de DNA, a qual pode incurrir custos, consumir tempo e incorrer em contaminação cruzada com outros agentes. No entanto, existem fatores que podem dificultar esta técnica, McCABE, (1991) e WILSON (1997) citam substâncias presentes no sangue e tecidos que podem interferir com a lise das células e/ou inativar a DNA polimerase termoestável. Neste trabalho foi utilizado fragmentos de tecido hepático para avaliar se não haveria interferência e/ou inibição na reação de PCR direta. A escolha do tecido hepático baseou-se nas pesquisas de KOJIMA et al. (2001) e ASSIS et al. (2005) que identificaram *C. chauvoei* em amostras deste tecido por meio da PCR. Destaca-se, aqui, também a importância de haver uma prévia fixação em metanol do tecido já impregnado no papel filtro que, segundo McCABE, (1991), contribui para prevenir a inibição da PCR. Outra dificuldade para a PCR direta seria a capacidade de esporulação de *C. chauvoei* principalmente de amostras com longo tempo de armazenamento, porém neste trabalho, supõe-se que o uso do aquecimento prévio das amostras contornaria este problema com sugerido por HERMAN et al. (1995).

Pesquisadores como McCABE et al. (1991) e MAW et al. (2006) defendem o uso de PCR direta a partir de tecidos impregnados em papel filtro, pois simplificam a remessa do material para diagnóstico laboratorial. Por meio dos resultados aqui encontrados, o papel filtro comum constituiu uma alternativa prática e econômica para o diagnóstico definitivo de

carbúnculo sintomático. Porém, há necessidade de incluir estudos *in vivo* para uma avaliação do método de diagnóstico do carbúnculo sintomático baseado no uso do papel filtro.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ambos pela bolsa concedida. Ao Laboratório de Produção de Material de Referência (LANAGRO-MG) pelo fornecimento da cepa de *C. chauvoei* ATCC 10092.

## **REFERÊNCIAS**

ASSIS, R.A. et al. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.82, p.68-70, 2001.

ASSIS, R.A. et al. Reação em cadeia da polimerase para detecção de *Clostridium chauvoei* em tecidos de *Cavia porcellus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.12, p.1247-1250, 2005.

BU, Y. et al. Direct polymerase chain reaction (PCR) from human whole blood and filter-paper-dried blood by using a PCR buffer with a higher pH. **Analytical Biochemistry**, v.375, p.370-372, 2008.

HERMAN, L.M.F. et al. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.12, p.4141-4146, 1995.

KOJIMA, A. et al. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.363-371, 2001.

MABONI, F. et al. Mastite gangrenosa bovina por *Clostridium perfringens*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, 456-459, 2008.

MAW, T. et al. A practical tissue sampling method using ordinary paper for molecular detection of infectious bursal disease virus RNA by RT-PCR. **Avian Disease**, v.50, p.556-560, 2006.

McCABE, E.R.B. Utility of PCR for DNA Analysis from dried blood spots on filter paper blotters – Review. **Genome Research**, v.1, p.99-106, 1991.

SASAKI, Y. et al. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.257-267, 2002.

SCHWARTZ, E.I. et al. Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on Guthrie's card. **The Lancet**, v.336, n.8715, p.639-640, 1990.

SONGER, J.G. Histotoxic clostridia. In: GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4.ed. Iowa:Blackwell Publishing, 2010. Cap.12, p.203-210.

TAKEUCHI, S. et al. Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.9, p.853-855, 1997.

USEH, N.M. et al. Blackleg in ruminants. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.1, n.40, p.1-8, 2006.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3741-3751, 1997.

## **4 CAPÍTULO 2**

**Testes de vacinas frente ao desafio com uma cepa de campo de *Clostridium chauvoei***

**Luana D'Avila Farias, Agueda Castagna de Vargas**

(Artigo a ser submetido para publicação - Pesquisa Veterinária Brasileira)

**ABSTRACT-** Farias, L.D. & Vargas, A.C. 2010. [**Tests of vaccines upon challenge using a field strain of *Clostridium chauvoei***]. Testes de vacinas frente ao desafio com uma cepa de campo de *Clostridium chauvoei*. Pesquisa Veterinária Brasileira. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Bacteriologia (LABAC). Avenida Roraima, nº 1000, Sala 5137, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, Brasil. E-mail: [agueda.vargas@gmail.com](mailto:agueda.vargas@gmail.com)

Blackleg is an acute and often fatal infection that affects mainly cattle, whose causative agent is *Clostridium chauvoei*. Vaccination using inactivated vaccines is recommended to control the disease of cattle. Blackleg vaccines sold in Brazil have been tested by efficiency test conducted by the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brazil) (equivalent to Department of Agriculture). Official Strain MT (Manguinhos-Teixeira) is the standard strain used for challenge in these tests. However, it is believed that there are differences in virulence and immunogenicity degrees among *C. chauvoei* strains maintained in the laboratory and the field ones. Therefore, the aim of this paper was to verify the potency of two polyvalent clostridial vaccines (A and B vaccines) tested against the field strain (SBP 07/09) of *C. chauvoei* and in parallel with the MT reference strain. For this purpose the assays were made through the challenge in immunized guinea pig and subsequent evaluation of the humoral response of guinea pigs by using ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). At the end of the experiment, all vaccinated guinea pigs remained alive and no clinical signs of the disease were observed, while the control group showed characteristic blackleg clinical signs and died within 24 to 48 hours. The vaccines tested were effective in stimulating the humoral response against both field strain SBP 09/07 and the reference strain MT of *C. chauvoei*. All four vaccinated and challenged groups seroconverted by the ELISA after vaccination and the control group remained seronegative. However, animals immunized with B vaccine had higher levels of antibodies detected when compared with guinea pig immunized with A vaccine.

INDEX TERMS: Vaccine potency, blackleg, clostridiosis, field strain.

**RESUMO.-** [**Testes de vacinas frente ao desafio com uma cepa de campo de *Clostridium chauvoei***] *Clostridium chauvoei* é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, doença de evolução rápida e fatal que acomete principalmente os bovinos. Para o controle da doença preconiza-se usar vacinas, que são, predominantemente, inativadas. As vacinas para carbúnculo sintomático comercializadas no Brasil passam por teste de eficiência realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A cepa oficial MT

(Manguinhos-Teixeira) é a amostra padrão e é usada para desafio nos testes. Porém, acredita-se que existam diferenças nos graus de virulência e imunogenicidade entre as cepas de *C. chauvoei* mantidas em laboratório e as existentes no campo. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de duas vacinas clostridiais polivalentes (vacinas A e B) frente ao desafio com a cepa de campo (SBP 07/09) de *C. chauvoei* e, em paralelo, com a cepa de referência MT. Para isto foi utilizado o desafio em cobaias imunizadas e posteriormente foi avaliada a resposta humoral pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Ao final do experimento, todas as cobaias vacinadas estavam vivas e sem sinais clínicos da doença, enquanto os animais dos grupos controle tiveram sinais característicos da doença e morreram no período de 24 a 48 horas. As vacinas testadas foram eficientes em estimular resposta imune, tanto frente à cepa de campo SB 07/09, quanto frente à cepa de referência MT de *C. chauvoei*. Quanto à resposta humoral evidenciada pelo ELISA, os quatro grupos vacinados e desafiados soroconverteram após a vacinação e os animais do grupo controle permaneceram soronegativos. Contudo, os animais imunizados com a vacina B apresentaram maiores índices de anticorpos detectados quando comparados com os animais imunizados com a vacina A.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Eficiência vacinal, carbúnculo sintomático, clostridioses, cepa de campo.

## INTRODUÇÃO

*Clostridium chauvoei* é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, doença que acomete principalmente os bovinos (Songer 2010). A erradicação deste agente é uma ação impraticável devido à capacidade de formar esporos e permanecer por longo período no ambiente (Songer 2010) somada ao caráter agudo da doença e insucesso de terapias antimicrobianas (Hirsh & Biberstein 2004). Por isto, a vacinação é a principal estratégia para controle do carbúnculo sintomático (Hirsh & Biberstein 2004, Kriek & Odendaal 2004).

As vacinas clostridiais comercializadas no Brasil, que são na grande maioria polivalentes e inativadas, têm o controle da qualidade e eficiência definidas pela legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil 1997). Entretanto, apenas as vacinas contra *C. chauvoei*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (toxinas beta e épsilon) são submetidas ao controle oficial do MAPA.

A preocupação em testar a eficiência das vacinas contra *C. chauvoei* ocorre em vários países e se deve às possíveis diferenças no grau de imunogenicidade e virulência destas cepas (Kerry 1967, Chandler & Gulasekharam 1970, Mattar et al. 1999, Naz et al. 2005) que poderiam ser a causa de falhas vacinais, relatadas tanto no exterior (Reed & Reynolds 1977, Srinivasan & Venugopallan 1997, Corpus et al. 2008) quanto no Brasil (Gregory et al. 2006).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de duas vacinas clostridiais polivalentes frente a uma cepa de campo de *C. chauvoei*, por meio de desafio em cobaias imunizadas e da sua resposta humoral no teste imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Cepas de *Clostridium chauvoei*.**

O desafio em cobaias imunizadas, conforme está regulamentado pelo MAPA (Brasil 1997), e os antígenos utilizados no teste imunoenzimático consistiram de duas cepas diferentes de *C. chauvoei*: A cepa de referência denominada MT fornecida pelo LANAGRO-RS (Laboratório Nacional Agropecuário) e uma cepa (SBP 07/09<sup>1</sup>) isolada de infecção natural de bovino pertencente a um estabelecimento de criação no Rio Grande do Sul, identificada fenotípica e genotipicamente, segundo Quinn et al. (1994) e Sasaki et al. (2002), respectivamente.

### **Vacinas testadas.**

Foram testadas a primeira partida de uma vacina importada da Hungria ainda não comercializada no Brasil (Vacina A) composta por bacterina de *C. chauvoei* e toxinas de *C. perfringens* A/C/D, *C. septicum*, *C. novyi* e *C. tetani* e, como referência, uma vacina comercial aprovada pelo MAPA (Vacina B) produzida com bacterinas de *C. chauvoei* e *C. haemolyticum* e toxóides de *C. perfringens* B/C/D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani* e *C. sordellii*.

### **Animais experimentais.**

Cobaias (*Cavia porcellus* da linhagem Dunkin-Hartley) machos de aproximadamente 400g de peso à primeira vacinação foram fornecidas pelo LANAGRO-SP. Toda a

---

<sup>1</sup> SBP = Setor de Bacteriologia na área de Pesquisa.



manipulação dos animais durante o experimento assim como a eutanásia dos mesmos foram realizados conforme a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSM (Número do Processo: 01/2009).

#### **Dose letal 50%.**

A dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) da cepa de campo SBP 07/09 foi calculada pelo método de Reed & Muench (1938) e pré-estabelecida em  $1 \times 10^5 DL_{50} mL^{-1}$ . A cepa de referência MT esporulada, utilizada rotineiramente para o teste oficial de eficiência das vacinas clostridiais disponíveis comercialmente no Brasil, foi fornecida pelo LANAGRO-RS (CGAL/SDA-MAPA, Porto Alegre, RS) na titulação de  $6 \times 10^4 DL_{50} mL^{-1}$ .

#### **Teste de eficiência em cobaias.**

Os animais foram vacinados e desafiados de acordo com o regulamento técnico aprovado pela Portaria-SDA 49/1997 do MAPA (Brasil 1997). As cobaias foram divididas em quatro grupos vacinados e mais dois grupos controle. Dois grupos de oito cobaias receberam a vacina A; outros dois grupos a vacina B e os grupos controle, compostos por cinco cobaias cada, não foram vacinados (Quadro 1). A revacinação ocorreu aos 21 dias após a primeira vacinação. As vacinações foram realizadas utilizando-se 1/5 da dose bovina recomendada pelo fabricante por via subcutânea na área torácica ventral (Quadro 1) (Brasil 1997). Tanto os animais vacinados quanto os do grupo controle foram desafiados aos 14 dias após a revacinação com 0,5mL da suspensão de esporos de *C. chauvoei* por via intramuscular contendo 100  $DL_{50}$  da cepa de referência MT e da cepa de campo SBP 07/09 em  $CaCl_2$  à concentração final de 5%. Depois de desafiadas, as cobaias foram observadas por 72 horas, e as mortes ocorridas neste período foram registradas (Quadro 2). Os critérios de julgamento estão estabelecidos pelo regulamento técnico anexo à Portaria-SDA nº. 49/97 (Brasil 1997), o qual diz que a prova é considerada válida quando no mínimo quatro das cinco testemunhas não sobreviverem e para ser considerada eficiente a vacina deve proteger no mínimo sete de oito cobaias vacinadas.

#### **Teste imunoenzimático (ELISA).**

Após as 72 horas de observação, amostras de sangue foram colhidas de cada cobaia para a obtenção de soro sanguíneo a serem usados em teste imunoenzimático (ELISA). O ELISA foi padronizado utilizando-se *pool* de amostras de soro de todas as cobaias vacinadas como controle positivo e de cobaias não vacinadas como controle negativo.

### **Produção do antígeno.**

Para sensibilização das placas, os antígenos a partir da cepa de referência (MT) e da cepa de campo (SBP 07/09) de *C. chauvoei* foram padronizados segundo recomendado por Crichton et al. (1990) e levando em consideração a fase de crescimento de maior imunogenicidade da cultura de *C. chauvoei* conforme Mattar et al. (2002), ou seja, foi obtido da cultura de *C. chauvoei* no início da fase estacionária ( $\pm 14$ h). A cultura foi centrifugada à 4000 rpm por 20 minutos e lavada duas vezes com salina tamponada em fosfato (PBS) (NaCl 0,14 M em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,2). A massa celular foi suspensa em solução tamponada de fosfato de sódio pH 8,9 e as células foram sonicadas usando um sonicador *Vibra cell* (Homo mix D 500) por 10 minutos a 20kHz em um ciclo descontínuo. O antígeno foi armazenado sob  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização.

### **Procedimentos para o teste ELISA.**

O ELISA foi realizado em microplacas (Nunc®) de 96 poços sensibilizados com 100 $\mu\text{L}$ /poço do antígeno em teste (concentração especificada na Tabela 2) diluído em tampão carbonato bicarbonato (TCB) pH 9,6, na diluição 1:100, e incubados por 12 horas à  $4^{\circ}\text{C}$ . O bloqueio foi realizado com 200 $\mu\text{L}$ /poço de TCB acrescido de 10% de leite em pó desnatado (Molico®) e as placas foram incubadas à  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Então a solução de bloqueio foi removida, e 100 $\mu\text{L}$  do soro teste e controle foram diluídos em 1:50 em PBS acrescido de leite em pó desnatado à 10%. Dois poços ficaram sem soro e somente o tampão foi acrescentado a estes, que foram os poços controle (branco). Após este passo, as placas foram incubadas à  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos. Os poços das placas foram lavados por três vezes com PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 (TBS) e posteriormente incubados por 90 minutos à  $37^{\circ}\text{C}$  com 100 $\mu\text{L}$ /poço do conjugado imunoenzimático comercial (Bethyl®), o qual consistia de anti-Imunoglobulina G (IgG) de cobaias conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em PBS + leite em pó desnatado. Imediatamente após o último ciclo de lavagem, as placas foram processadas à temperatura ambiente em local escuro com 50 $\mu\text{L}$  do substrato o-phenylenediamine (OPD) (Sigma®) diluído em solução tampão citrato-fosfato pH 5,0. A reação foi interrompida em 15 minutos com ácido sulfúrico na concentração de 3%. A leitura da OD (*optical density*) foi feita com espectrofotômetro a 450nm (KPL 2005).

### **Análise estatística.**

Os dados do ELISA foram transformados por log (OD) e submetidos à análise de variância das medidas repetidas para verificar a normalidade de homocedasticidade. Estes dados foram comparados utilizando-se o teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

Os resultados obtidos no teste de eficiência das vacinas estão apresentados no Quadro 2. Nenhuma das cobaias dos grupos A e B apresentaram sinais clínicos e/ou óbito após o desafio, ou seja, as vacinas foram eficientes em proteger todas as cobaias vacinadas contra o desafio direto com 100 vezes a  $DL_{50}$ , tanto da cepa de campo de *C. chauvoei* SBP 07/09, quanto da cepa de referência MT. As cobaias vacinadas permaneceram sem sinais clínicos da doença durante todo o período experimental, não apresentaram reações adversas à vacinação ou à revacinação. Já os animais dos grupos controle apresentaram sinais característicos da doença, como necrose e aumento de volume das massas musculares no local da inoculação e morreram entre 24 a 48 horas após a inoculação (Quadro 2).

Quanto à resposta humoral, os quatro grupos vacinados e desafiados soroconverteram após a vacinação. As médias de OD por grupo estão apresentadas no Quadro 2. As cobaias do grupo controle permaneceram soronegativas. As cobaias inoculadas com a vacina B tiveram maiores índices de OD quando comparadas com as cobaias inoculadas com a vacina A. Nas cobaias inoculadas com a vacina A, quando desafiados com a cepa MT, as médias da OD detectadas foram de 0,277 e 0,318, enquanto com a vacina B foram de 0,367 e 0,405. Quando o desafio foi com a cepa SBP 07/09, a vacina A produziu ODs médias de 0,181 e 0,255, enquanto as médias da vacina B foram de 0,291 e 0,355, utilizando-se os dados das placas sensibilizadas com antígeno MT e com antígeno da cepa SBP07/09, respectivamente (Quadro 2).

As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ocorreram entre a média da OD dos animais vacinados com a vacina B e desafiados com a cepa de referência (MT) e os animais vacinados com a vacina A e desafiados com a cepa de campo (SBP 07/09), independentemente do antígeno que sensibilizou a placa. Houve diferença, na placa sensibilizada com a cepa de campo, entre a média da OD das cobaias do grupo B desafiadas com a cepa MT e as cobaias do grupo A também desafiadas com a cepa MT (Quadro 2).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as vacinas testadas induziram resposta humoral e foram capazes de proteger os animais imunizados frente ao desafio com a cepa padrão (MT) e a cepa de campo (SBP 07/09).

O desafio em cobaias imunizadas é o método utilizado legalmente para liberação de partidas de vacinas em produto pronto para o comércio. A legislação vigente em vários países tem uma padronização corrente (British Pharmacopoeia 1998, EUA 1991, Brasil 1997) para vacinas contendo *C. chauvoei* que requerem este teste de eficiência de todas as partidas de vacinas a ser realizado pelo fabricante e por órgãos oficiais.

Acredita-se que um dos motivos pelos quais estas partidas devem ser submetidas ao teste de eficiência seriam diferenças de reatividade sorológica cruzada entre diferentes cepas, pois, segundo Reed & Reynolds (1977), Woolcock & Frost (1978) e Kriek & Odendaal (2004) existem relatos de falhas vacinais acarretando surtos de carbúnculo sintomático em bovinos vacinados, tanto no exterior (Srinivasan & Venugopallan 1997, Corpus et al. 2008, Miranda et al. 2008) quanto no Brasil (Santos 2003, Gregory et al. 2006). Este fato é reforçado pela menção das diferenças no grau de imunogenicidade e virulência das cepas de *C. chauvoei* citadas por autores como Kerry (1967), Chandler & Gulasekharan (1970), Mattar et al. (1999) e Naz et al. (2005), assim como a existência de cepas mutantes aflageladas com virulência e imunogenicidade significativamente menores estudadas por Tamura et al. (1995) e Kijima-Tanaka et al. (1997) e a variação das proteínas imunogênicas de antígenos celulares associadas à fase de crescimento da cultura de *C. chauvoei* alegada por Mattar et al. (2002).

Embora estes relatos de surtos ocorridos em animais imunizados apontem a uma possível diferença antigênica entre *C. chauvoei*, no presente estudo o desafio da vacina A e B frente a duas cepas diferentes não resultaram em doença clínica e morte, inferindo-se proteção em cobaias. Ainda que não se saiba quais são os antígenos que compõem as vacinas, pode-se dizer que provavelmente são antigenicamente relacionadas às amostras utilizadas no desafio. Este resultado foi comprovado pela proteção após o desafio de todas as cobaias vacinadas e morte de todas as cobaias dos grupos controle. Além disto, o teste de reatividade sorológica cruzada entre as duas cepas utilizadas para o desafio demonstrou a existência de relação antigênica (dados não apresentados).

Deve-se deixar claro que não se exclui a existência de variabilidade antigênica. No entanto, no presente estudo, não foi evidenciada falha na proteção após desafio. Isto pode estar relacionado às amostras utilizadas para desafio assim como das vacinas em teste.

Estudos futuros, com diferentes isolados, preferencialmente não relacionados antigenicamente, terão que ser conduzidos para determinar a importância da variabilidade antigênica em menor proteção ou falha vacinal.

Chandler (1976) defende a necessidade da seleção de cepas altamente virulentas para desafio no teste de eficiência para as vacinas de carbúnculo sintomático e que realmente sejam efetivas em desafiar a proteção conferida pelas vacinas. No entanto, no Brasil, a cepa utilizada para desafiar as partidas de vacinas comerciais, a cepa de referência MT, não foi selecionada por apresentar melhor desempenho para este fim e sim pela melhor facilidade de cultivo, manipulação e manutenção (Corseuil 2010), diferente de cepas utilizadas em outros países (CH3 e CH4) (Kerry 1967, Chandler & Gulasekharam 1970, Crichton et al. 1990). Ainda, a cepa MT mostrou-se falha no trabalho de Santos (2003) quando comparada com cepa de campo no teste de eficiência de vacinas comercializadas no Brasil, pois enquanto 95% das vacinas foram aprovadas quando a cepa desafio era a MT, somente 37% se mostraram eficientes quando a cepa desafio era a cepa de campo (SP). Por esta razão, no presente estudo, o teste de eficiência das vacinas foi realizado com uma cepa de campo isolada de caso clínico de carbúnculo sintomático, no entanto, diferentemente do achado de Santos (2003), as duas vacinas testadas foram eficientes em induzir proteção em cobaias mesmo frente a uma cepa de campo SBP 07/09. Isto pode ser justificado pela homologia antigênica existente entre as duas cepas utilizadas para o desafio neste trabalho (dados não apresentados).

No Brasil, as partidas de vacinas contra carbúnculo sintomático são submetidas ao teste de eficiência conforme está regulamentado pelo MAPA (Brasil 1997). Estas diretrizes regulatórias asseguram que as partidas de vacinas testadas tenham consistente potencial para produzir imunidade. Assim estas partidas das duas vacinas seriam aprovadas, logo, estes resultados não põem em dúvida o teste e nem a eficiência das vacinas.

A OD mensurada por ELISA do soro das cobaias, participantes do teste de eficiência das vacinas é uma medida indireta dos anticorpos séricos. Esta técnica já é comprovadamente apropriada para determinar a eficiência de vacinas que contenham o antígeno de *C. chauvoei* (Crichton 1990, Hamaoka et al. 1990), pois muitos autores como Chandler (1975), Stevenson & Stonger (1980) e mais recentemente Micalizzi & De Guzmán (1997) afirmam que a imunidade contra este microrganismo é estimulada principalmente por proteínas celulares do agente e a resposta pode ser mensurada por meio da detecção de anticorpos que são responsáveis pela proteção (Mattar et al. 1999).

Portanto, o ELISA permitiu mensurar a resposta imune humoral induzida após vacinação e desafio com ambas as cepas utilizadas neste trabalho, possibilitando a

comparação mais efetiva entre as vacinas e a imunogenicidade das cepas. As cobaias inoculadas com a vacina B apresentaram maiores índices de anticorpos detectados quando comparados com as cobaias inoculadas com a vacina A. A principal diferença ocorreu entre as cobaias do grupo B desafiadas com a cepa MT em relação às cobaias do grupo A desafiadas com a cepa de campo. Quando se compara a detecção de anticorpos nos animais do grupo A e B, pode-se observar que nas cobaias que foram desafiadas com a MT os níveis de anticorpos foram superiores aos detectados nas cobaias desafiadas com a cepa de campo. No entanto, não foi detectada diferença estatística entre os animais imunizados com a vacina B e desafiados com a cepa de campo e os animais imunizados com a vacina A e desafiados com a MT. Isto sugere uma superioridade da vacina B em induzir a formação de anticorpos em relação à vacina A.

Estes resultados concordam com Araújo et al. (2010) quando afirmam que a resposta humoral com a cepa de campo em alguns casos foi inferior a cepa MT e que esta diferença pode ser decisiva conforme a intensidade do desafio de cepas locais à campo. Porém, cabe ressaltar que no presente estudo, embora existam diferenças em relação à resposta frente às duas cepas e em relação às vacinas, as cepas utilizadas para desafio apresentaram homologia no teste ELISA e não houve diferença em relação à proteção vacinal.

Embora seja desconhecida a composição de antígenos das vacinas utilizadas neste estudo, pode-se supor, por meio dos resultados encontrados neste trabalho e resultados apresentados por Santos (2003) e Araújo et al. (2010), que as cepas utilizadas na formulação das vacinas têm maior grau de homologia com a cepa MT do que com algumas cepas de campo, mesmo que a cepa de campo SBP 07/09 também apresente elevado grau de homologia com a cepa MT. Cabe lembrar que estudos como os de Chandler 1976 e Mattar et al. (1999) enfatizam o uso de cepas regionais de *C. chauvoei* na composição de vacinas contra carbúnculo sintomático como forma de evitar surtos por falhas vacinais.

Mais estudos necessitam ser realizados para procurar diferenças entre isolados de *C. chauvoei* que possam explicar a existência dos diferentes graus de antigenicidade e virulência. Assim, poder avaliar com maior precisão qual cepa de *C. chauvoei* poderia ser manipulada e usada nos testes dos fabricantes e nos testes oficiais para possibilitar maior eficiência das partidas de vacinas clostridiais.

## CONCLUSÃO

As duas partidas de vacinas clostridiais testadas induziram resposta humoral e foram capazes de proteger as cobaias vacinadas frente ao desafio com a cepa de campo SBP 07/09 e a cepa de referência MT. O teste imunoenzimático permitiu a comparação mais efetiva das vacinas A e B, demonstrando maiores índices de resposta humoral nas cobaias vacinadas com a vacina B e nas cobaias desafiadas com a cepa de referência MT.

**Comitê de ética e biossegurança.-** O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSM (Número do Processo: 01/2009).

**Agradecimentos.-** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ambos pela bolsa concedida. Ao LANAGRO-RS (CGAL/SDA-MAPA, Porto Alegre, RS) pelo fornecimento da cepa de referência MT, informações e conhecimento. Ao LANAGRO-SP (CGAL/SDA-MAPA, Campinas, SP) pelo fornecimento das cobaias de informações técnicas para a criação.

## REFERÊNCIAS

- Araújo R.F., Curci V.C.L.M., Nobrega F.L.C., Ferreira R.M.M. & Dutra, I.S. 2010 Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):554-558.
- Brasil 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria-SDA 49/1997, de 12 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169, Brasília.
- British Pharmacopeia 1998. Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines. London: Department of Health and Social Security, Medicines Commission.
- Chandler H.M. 1975. Rabbit immunoglobulin response to the flagella, somatic and protective antigens of highly protective strains of *Clostridium chauvoei*. *Infeci. Immun.* 12(1):143-147.
- Chandler H.M. 1976. Some observations on the quality control testing of *Clostridium chauvoei* vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 32:137-141.
- Chandler H.M. & Gulasekharam J. 1970. An evaluation of characteristics of *Cl. chauvoei* which possibly indicate a highly protective strain. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 48:187-197.

- Corpus M.L.O., Andrade L.H., Mendez J.L., Gutierrez V.T. 2008. Prevention of Blackleg by an Immunogen of *Clostridium chauvoei*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149:303–305.
- Corseuil R.F. 2010. Comunicação pessoal (Fiscal Federal Agropecuário) LANAGRO-RS (CGAL/SDA-MAPA, Porto Alegre, RS).
- Crichton R., Solomon J. & Barton A.M. 1990. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens. *Biologicals*.18:49-54.
- EUA. Code of Federal Regulations, Title 9 (CFR-9). Animals and animal products: *Clostridium chauvoei* bacterin. Washington (DC):Office of the Federal Register Natl. Archives and Records Administration, U. S. Government Printing Office, 1991. Chapter I, § 113.106 c. p.592-593.
- Gregory L., Della Libera A.M.M., Birgel Junior E.H., Pogliani F.C., Birgel D.B., Benesi F.J., Miyashiro S. & Baldassi, L. 2006. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de “manqueira”. *Arq Inst. Biol.* 73(2):243-246.
- Hamaoka T., Mori Y. & Terakado N. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in mice vaccinated with blackleg vaccine. *Japan. J. Vet. Sci.* 52:167-170.
- Hirsh D.C. & Biberstein, E.L. 2004. *Clostridium*. p.198-214. In: Hirsh D.C., Maclachlan N.J. & Walker R.L. *Veterinary microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa:Blackwell Publishing.
- Kerry J.B. 1967. Immunological differences between strains of *Clostridium chauvoei*. *Res. Vet. Sci.* 8:89-97.
- Kijima-Tanaka M., Ogikubo Y., Kojima A., Tamura Y. 1997. Development of two-site enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of flagellar antigen in blackleg vaccines. *J. Microbiol. Methods*.31:83-88.
- Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 2004. *Clostridium chauvoei* infections, p. 1856-1862. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C. *Infectious diseases of livestock*. Vol.3. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Mattar M.A., Cortiñas T.I. & De Guzmán A.M.S. 2002. Immunogenic protein variations of *Clostridium chauvoei* cellular antigens associated with the culture growth phase. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*33:9-14.
- Mattar M.A., Cortiñas, T.I, Di Genaro M.S. & De Guzmán A.M.S. 1999. Immunogenic power of cellular and extracellular antigens of *Clostridium chauvoei* strains isolated in San Luis, Argentina. *Anaerobe.* 5:295-296.
- Micalizzi B. & De Guzmán A.M.S. 1997. Protective activity of different immunosera against *Clostridium chauvoei*. *Anaerobe*.3:127-129.



- Miranda A., Fort M., Carloni G. & Bedotti D. 2008. Evaluación de La respuesta serológica de vacunas comerciales frente a *Clostridium chauvoei*. Vet. Argent. 23:130-136.
- Naz S., Ahmad S. & Bhatti J.I. 2005. Isolation and identification *Clostridium chauvoei* from cattle and buffaloes. Pakistan Vet. J. 25(2):101-102.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. & Carter G.R. 1994. *Clostridium* species p.191-208. In: Quinn et al. Clinical Veterinary Microbiology. London:Wolfe.
- Reed G.A. & Reynolds L. 1977. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. Aust. Vet. J. 53:393.
- Reed L.J. & Muench H.A. 1938. A simple method of estimating of fifty percent endpoints. The American Journal of Hygiene. 27(3):493-497.
- Santos B.A. 2003. Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 35p.
- Sasaki Y., Kojima A., Aoki H. Ogikubo Y., Takikawa N. & Tamura Y. 2002. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. Vet. Microbiol. 86:257-267.
- Songer J.G. Histotoxic clostridia. 2010. p.203-211. In: Gyles C.L., Prescott J.E., Songer J.G. & Thoen C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4<sup>nd</sup> ed. Iowa: Blackwell Publishing.
- Srinivasan E.V.R. & Venugopallan A.T. Studies on post-vaccinal immune response of black quarter vaccine in cattle. 1997. Indian Vet. J. 74(4):279-280.
- Stevenson J.R. & Stonger K.A. 1980. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. Am. J. Vet. Res. 41(4):650-653.
- Tamura Y., Kijima-Tanaka M., Aoki A., Ogikubo Y. & Takahashi T. 1995. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. Microbiology, 141:605-610.
- Woolcock J.B. & Frost A.J. 1978. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. Aust. Vet. J. 54:319.

**Quadro 1 – Delineamento amostral: grupos de cobaias conforme a vacina clostridial polivalente utilizada, dose e via de aplicação e a cepa desafio de *C. chauvoei* inoculada após revacinação.**

<b>Grupos</b>	<b>Vacinas</b>		<b>Cepa Desafio</b>	
	Dose	VIA	Cepa SBP07/09	Cepa MT
<b>Vacina A</b>	0,8mL	SC	8 cobaias	8 cobaias
<b>Vacina B</b>	0,6mL	SC	8 cobaias	8 cobaias
<b>Controle</b>	-	-	5 cobaias	5 cobaias

**Quadro 2 - Resultado do teste de eficiência das vacinas clostridiais polivalentes A e B e os valores médios  $\pm$  desvio padrão da resposta humoral das cobaias expressas em densidade óptica (OD) no teste ELISA dos grupos vacinados com as vacinas A e B e desafiados com a cepa de referência (MT) e a cepa de campo (SBP 07/09) de *C. chauvoei*.**

Grupos	Teste de eficiência		Resposta sorológica	
	Cepas desafio	Cobaias protegidas/Cobaias Inoculadas	Média da OD*	
			MT**	SBP 07/09**
Vacina A	MT	8/8	0,277 $\pm$ 0,014 <sub>ab</sub>	0,318 $\pm$ 0,009 <sub>B</sub>
	SBP 07/09	8/8	0,182 $\pm$ 0,050 <sub>b</sub>	0,255 $\pm$ 0,019 <sub>C</sub>
Vacina B	MT	8/8	0,367 $\pm$ 0,015 <sub>a</sub>	0,405 $\pm$ 0,006 <sub>A</sub>
	SBP 07/09	8/8	0,291 $\pm$ 0,034 <sub>ab</sub>	0,355 $\pm$ 0,066 <sub>AB</sub>
Controle	MT	0/5	0,048 $\pm$ 0,002 <sub>CD</sub>	
	SBP 07/09	0/5	0,049 $\pm$ 0,001 <sub>CD</sub>	

\*(Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

\*\* Concentração protéica total realizada por meio de Labtest (*Kit*), MT = 2,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; cepa SBP 07/09 = 3,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se, neste estudo, que o diagnóstico molecular do carbúnculo sintomático a partir do papel filtro comum constitui uma alternativa em potencial para facilitar a coleta, armazenamento e remessa de tecido hepático bovino ao laboratório.

Foi confirmada a sensibilidade da técnica da PCR com o uso do papel filtro comum até o mínimo de  $10^2$  UFC, e a especificidade da técnica com os microrganismos utilizados neste trabalho, tal como encontrado na literatura.

No teste de viabilidade de *C. chauvoei* no papel filtro comum impregnado com tecido hepático bovino, foram visualizadas ampliações até o período de uma semana pós-coleta. Porém, faz-se necessário estudo *in vivo* para melhor avaliação deste método.

As vacinas clostridiais polivalentes (A e B) mostraram-se eficientes no teste com cobaias imunizadas frente ao desafio com a cepa de campo SBP 07/09 e a cepa de referência MT de *C. chauvoei*.

O teste de ELISA permitiu uma comparação mais efetiva da resposta humoral das cobaias vacinadas com as vacinas clostridiais polivalentes A e B, demonstrando maior diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) dos índices das médias da OD entre as cobaias vacinadas com a vacina clostridial B e desafiadas com a cepa MT e as cobaias vacinadas com a vacina clostridial A e desafiadas com a cepa de campo SBP07/09 de *C. chauvoei*.

Faz-se necessário estudo mais efetivos para estabelecer se há diferença significativa entre cepas de *C. chauvoei* que podem influenciar na efetividade das vacinas clostridiais frente à cepas de campo

O presente trabalho trouxe contribuições no processo de prevenção e desenvolvimento de métodos diagnósticos para o carbúnculo sintomático, uma relevante doença, tanto do ponto de vista econômico quanto da saúde animal.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, R.F.; CURCI, V.C.L.M.; NOBREGA, F.L.C.; FERREIRA, R.M.M.; DUTRA, I.S. Esquemas de vacinação e cepa bacteriana influenciam na resposta sorológica contra o carbúnculo sintomático em bezerros de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.7, p.554-558, 2010.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; DIAS, L.D.; UZAL, F.A.; MARTINS, N.E.; SILVA, N. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.82, p.68-70, 2001.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; NASCIMENTO, R.A.P.; MABONI, F.; PIRES, P.S.; SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; VARGAS, A.P.C. Mionecroses clostridiais bovinas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.331-334, 2010.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R.; SANTOS, R.L.; DIAS, G.R.C.; NASCIMENTO, R.A.P.; ABREU, V.L.V.; UZAL, F.A. Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n.1, p. 4-8, 2005a.

ASSIS, R.A.; FACURY, E.J.F.; LOBATO, F.C.F.; CARVALHO A. Ú.; FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.V.A. Outbreak of black leg in calves. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.945-947, 2005b.

ASSIS, R.A.; LOBATO F.C.F.; SALVARANI, F.M.; LIMA, C.G.R.D.; UZAL, F.A. Detection of several clostridia by a direct fluorescent antibody test in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1319-1322, 2007.

ASSIS, R.A. *et al.* PCR multiplex para identificação de isolados de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.294-298, 2008.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). Exportações de carne bovina do Brasil (período jan-nov 2010). Acesso em 03 de jan de 2011. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/EXP%20JAN%20-%20NOV%2010.pdf>>

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

BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E.M.B. CHIBA, S.; MOULIN, A.A.P. Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos. **O Biológico**, v.51, n.6, p.161-165, 1985.

BARNES, D.M.; BERGELAND, M.E.; HIGBEE, J.M. Diferencial diagnosis of clostridial myonecrosis. **Canadian veterinary journal**, v.16, n.12, p.357-359, 1975a.

BARNES, D.M.; BERGELAND, M.E.; HIGBEE, J.M. Selected blackleg outbreaks and their relation to soil excavation. **Canadian Veterinary Journal**, v.16, n.9, 1975b.

BATTY, I.; WALKER, P.D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by use of fluorescent labelled antibodies. **Journal of Pathology Bacteriology**, v. 85. p. 517-521. 1963.

BENAVIDES, M.V.; TRINDADE, A.M.S. Sistema de criação para a terminação de bovinos de corte na região sudoeste do Rio Grande do Sul. **EMBRAPA**, versão eletrônica. Ago/2008. Acesso em 28 de ago. de 2009. Disponível em:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/importancia.htm>>

BISPING, W.; AMTSBERG, G. **Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animal**. Berlin; Hamburg:Parey, 1988. 339p.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – dezembro de 2010**. Acesso em 21 de Dez. de 2010. Disponível em:  
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=p&o=21>>

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 PHARMACOPOEIA. **Veterinary antisera and veterinary vaccines**. London: Department of Health and Social Security, Medicines Commission, 1998.

CHANDLER, H.M. Rabbit immunoglobulin response to the flagella, somatic and protective antigens of highly protective strains of *Clostridium chauvoei*. **Infection and Immunity**, v.12, n.1, p.143-147, 1975.

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

CHANDLER, H.M.; GULASEKHARAM, J. 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.74, p.128-134, 1974.

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

CHANDLER, H.M. Some observations on the quality control testing of *Clostridium chauvoei* vaccines. **Developments in Biological Standardization**, v.32, p.137-141, 1976.

CONESA, L.C.G.; VANELLI, S.A.; UZAL, F.A. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. **Veterinary Research Communications**, v.19, p.451-456, 1995.

CORPUS, M.L.O.; ANDRADE, L.H.; MENDEZ, J.L.; GUTIERREZ, V.T. Prevention of Blackleg by an Immunogen of *Clostridium chauvoei*. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v.1149, p.303-305, 2008.

CORTINÃS, T.I.; MATTAR, M.A.; DE GUZMÁN, A.M.S. Alpha and beta toxin activities in local strains of *Clostridium chauvoei*. **Anaerobe**, v.5, p.297-299, 1999.

CRICHTON, R.; HARRISS, D.A.; MCKAY, D.J. Standards for *Clostridium chauvoei* vaccine – The relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent *C. chauvoei*. **Australian Veterinary Journal**, v.63, p.68-70, 1986.

DI GENARO, M.S.; MICALIZZI, B.; GUZMAN, A.M.S. *Clostridium chauvoei*: Immunological characterization of antigenic preparations. **Anaerobe**. v.5, p.301-303, 1999.

EUA [Leis, etc]. **Code of federal regulations**. Washington:Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1991. 743p.

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.

GONZÁLEZ, A.W.; ROTH, F. Cultivos celulares como sistema diferencial de cepas de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* aisladas em el norest de México. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.41, p.295-301, 1999.

GREGORY, L.; DELLA LIBERA, A.M.M.; BIRGEL, E.H.J.; POGLIANI, F.C.; BIRGEL, D.B.; BENESI, F.J.; MIYASHIRO, S.; BALDASSI, L. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de “manqueira”. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.243-246, 2006.

GROSSE-HERRENTHEY, A.; MAIER, T.; GESSLER, F.; SCHAUMANN, R.; BÖHNEL, H.; KOSTRZEWA, M.; KRÜGER, M. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS). **Anaerobe**, v.14, p.242-249, 2008.

HAINES, D.M.; CLARK, E.G. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. Review Article. **Canadian Veterinary Journal**, v.32, p.295-302, 1991.

HALM, A.; MARTIN, W.; KÖFER, J.; HEIN, I. Novel Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in Clostridial Myonecrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.4, p.1093-1098, 2010.

HAMAOKA, T.; TERAOKA, N. Demonstration of common antigens on cell surface of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* by indirect-immuno fluorescence assay. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, p.371-373, 1994.

HARWOOD, D.G.; HIGGINS, R.J.; AGGETT, D.J. Outbreak of intestinal and lingual *Clostridium chauvoei* infection in two-year-old Friesian heifers. **Veterinary Record**, v.161, p.307-308, 2007.

HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. Reviews. **Clinical Microbiology**, v.1, p.66-98, 1990.

HENDRIKSEN, C. F. M. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Use for Regulatory Testing: Current Best Scientific Practices for the Evaluation of Safety and Potency of Biologicals. **ILAR Journal**, v.43, p.43-48, 2002.

HIGGINSON, C.M. A note on blackleg. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.4, n.12, p.354-356, 1940.

HIRSH, D.C.; BIBERSTEIN, E.L. Clostridium. In: HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary microbiology**. 2 ed. Iowa:Blackwell Publishing, 2004. Cap.36. 536p.



JANVILISRI, T.; SCARIA, J.; GLEED, R.; FUBINI, S.; BONKOSKY, M.M.; GRÖHN, Y.T.; CHANG, Y.F. Development of a microarray for identification of pathogenic *Clostridium* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.66, p.140-147, 2010.

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 on Veterinary Science**, v.8, p.89-97, 1967.

KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKIZAKI, T.; SASAKI, Y.; OGIKUBO, Y.; TAMURA, Y. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.363-371, 2001.

KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKIZAKI, T.; SASAKI, Y.; OGIKUBO, Y.; KIJIMA, M.; TAMURA, Y. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.359-372, 2000.

KIJIMA-TANAKA, M.; NAKAMURA, M.; NAGAMINE, N.; TAKAHASHI, A.; AOKY, Y.; TAMURA, Y. Protection of mice against *Clostridium chauvoei* infection by anti-idiotypic antibody to a monoclonal antibody to flagella. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.8, p.183-188, 1994b.

KIJIMA-TANAKA, M.; TAMURA, Y.; SUZUKI, S.; NAGAMINE, N.; NAKAMURA, M. Antigenic mimicry of *Clostridium chauvoei* flagella by polyclonal anti-idiotypic antibodies. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.70-75, 1994a.

KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. *Clostridium chauvoei* infections. IN: COETZER, R.; TUSTIN, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**. Cape Town:Oxford Press. v.3, 2004. Cap.158. 1605p.

KUHNERT, P.; KRAMPE, M.; SELJA, E.C.; FREY, J.; NICOLET, J. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.291-298, 1997.

LANGE, M.; NEUBAUER, H., SEYBOLDT, C. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. **Molecular and Cellular Probes**. v.24, n.4, p.204-210, 2010.

LE MINOR; VÉRON, M. **Bactériologie médicale**, 2 ed. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1989, 1107p.

LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; ASSIS, R.A. Clostridioses dos pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.102, p.23-34, 2007.

MABONI, F. ASSIS, R.A.; VARGAS, A.C. Ocorrência de clostrídios isolados entre 1988 à 2007. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.3, p.343-347, 2010.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2 ed. London: Baltimore, 1980. 527p.

MACHEAK, M.E.; KLAUS, K.D.; MALOY, S.E. Potency testing *Clostridium chauvoei*-containing bacterins: relationship of agglutination titers and potency tests in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, n.5, p.1053-1058, 1972.

MALONE, F.E.; McPARLAND, P.J.; O'HAGAN, J. Pathological changes in the pericardium and meninges of cattle associated with *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Record**, v.118, p.151-152, 1986.

MATTAR, M.A.; CORTIÑAS, T.I.; DI GENARO, M.S.; DE GEZMÁN, A.M.S. Immunogenic power of cellular and extracellular antigens of *Clostridium chauvoei* strains isolated in San Luis, Argentina. **Anaerobe**, v.5, p.295-296, 1999.

MATTAR, M.A.; CORTIÑAS, T.I.; STEFANINI, A.M. Extracellular proteins of *Clostridium chauvoei* are protective in a mouse model. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.55, n.2, p.159-178, 2007.

MBENG, M.B. Isolement et identification au Sénégal d'un antigène soluble immunogène de *Clostridium chauvoei*, agent du charbon symptomatique des bovins. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.101, n.1, p.3-4, 2008.

MICALIZZI, B.; DE GUZMAN, A.M.S. Immunogenicity of na extract of *Clostridium chauvoei* in guinea pigs. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, n.2, p.171-172, 1997.

McCABE, E.R.B. Utility of PCR for DNA Analysis from dried blood spots on filter paper blotters – Review. **Genome Research**, v.1, p.99-106, 1991.

MOUSSA, R.S. Complexity of toxins from *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. **Journal of Bacteriology**, v.76, n.5, p.538-545, 1958.

NAZ, S.; AHMAD, S.; BHATTI, J.I. Isolation and identification *Clostridium chauvoei* from cattle and buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, v.25, n.2, p.101-102, 2005.

PETERSON, L.R.; KELLY, P.J.; NORDBROCK, H.A. Role culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhea. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.330-336, 1996.

PINTO, M.P.; ABREU, V.L.V. Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti-*Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p.513-520. 1992.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. 1994. *Clostridium* species p.191-208. In: Quinn et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. London:Wolfe, 1994. 648p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan,p. 683-685, 2002. 1737p.

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

RIET-CORREA, F. Carbúnculo Sintomático. In: Riet-Correa,F. et al., **Doenças de ruminantes e equinos**. Santa Maria:Pallotti, v.1, p.264-267, 2007. 722p.

SANTOS, B.A.; **Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil**. 2003. 35f. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H.; OGIKUBO, Y.; TAKIKAWA, N.; TAMURA, Y. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.257-267, 2002.

SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; AMIMOTO, K.; KOJIMA, A.; OGIKUBO, Y.; NORIMATSU, M.; OGATA, H.; TAMURA, Y. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*, **Research in Veterinary Science**, v.71, p.227-229, 2001.

SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KOJIMA, A.; TETSUKA, Y.; NORIMATSU, M.; TAMURA, Y. Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. **Journal Veterinary Medical Science**, v.62, p.1275-1281, 2000.

SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Genetic diversity among toxigenic clostridia isolated from soil, water, meat and associated polluted sites in south India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.27, n.4, p.311-320, 2009.

SCHIPPER, I.A. KELLING, C.L., MAYER, J.; PFFEIFER, N.E. Effects of passive immunity on immune response in calves following vaccination for blackleg. **Farm Research**, v.37, n.1, p.12-14, 1978.

SONGER, J.G. Histotoxic clostridia. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.E.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. Cap.12. 643p.

SRINIVASAN, E.V.R.; VENUGOPALLAN, A.T. Studies on post-vaccinal immune response of black quarter vaccine in cattle. **Indian Veterinary Journal**, v.74, n.4, p.279-280, 1997.

STERNE, M.; BATTY, I. **Pathogenic clostridia**. England: Butterworth & Cia, 1975, 144p.

STEVENSON, J.R.; STONGER, K.A. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. **American Journal of Veterinary Research**. v.41, n.4, p.650-653, 1980.

SULTANA, M.; AHAD, A.; BISWAS, P.K.; RAHMAN, M.; BARUA, H. Black quarter (BQ) disease in cattle and diagnosis of BQ septicemia based on gross lesions and microscopic examination. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v.25, n.1, p.13-16, 2008.

TANAKA, M.; HIRAYAMA, N.; TAMURA, Y. Production, characterization, and protective effect of monoclonal antibodies to *Clostridium chauvoei* flagella. **Infection and Immunity**. v.55, p.1779-1783, 1987.

TAMURA, Y.; KIJIMA, M.; OHISHI, K.; TAKAHASHI, T.; SUZUKY, S.; NAKAMURA, M. Antigenic analysis of *Clostridium chauvoei* flagella with protective and non-protective monoclonal antibodies. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.537-542, 1992.

TAMURA, Y.; MINAMOTO, TANAKA, S.; Demonstration of protective antigen carried by flagella of *Clostridium chauvoei*. **Microbiology and Immunology**. v.28, p.1325-1332, 1984.

TAMURA, Y.; KIJIMA-TAMAKA, M.; AOKI, A.; OGIKUBO, Y.; TAKASHASHI, T. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. **Microbiology**, v.41, p.605-610, 1995.

TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUM, P.E.; MENOZZI, M.G.; PECK, M.; PELKONEM, S.; POPOFF, M.; STACKEBRANDT; MAINIL, J. Genus *Clostridium* – Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. **European Concerted Action**, 2006. 214p.

TROXEL, T.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 of Animal Science**, v.75, p.19-25, 1997.

USEH, N.M.; ADAMU, S.; IBRAHIM, N.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N. Outbreaks of blackleg of cattle in northern Nigeria (1964-2003). **Slovenian Veterinary Research**, v.47, n.2, p.39-44, 2010.

USEH, N.M.; NOK, A.J.; AJANUSI, O.J.; BALOGUN, E.O.; OLADELE, S.B.; ESIEVO, K.A.N. **Veterinarski ARHIV**, v.74, n.4, p.289-298, 2004.

USEH, N.M.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N. Blackleg in ruminants. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.1, n.40, p.1-8, 2006.

UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M.; ASSIS, R.; MORRIS, W.; MIYAKAWA, M.F. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. **Veterinary Record**, v.152, p.134-136, 2003.

WALKER, P.D. Clostridium. In: CARTER, G.R.; COLE, J.R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5<sup>o</sup> ed. New York:Academic Press, 1990. Cap.19. 620p.