

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
***CAMPUS* DE JABOTICABAL**
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

RESPOSTA HUMORAL DE BOVINOS PARA OS TOXÓIDES
BOTULÍNICOS C E D

Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães Curci
Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

RESPOSTA HUMORAL DE BOVINOS PARA OS TOXÓIDES
BOTULÍNICOS C E D

Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães Curci
Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

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

Jaboticabal – SP

Junho - 2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI – nascida em Araçatuba, SP, em 28 de maio de 1974. Filha de José Carlos Magalhães e Vera Lúcia Lorenzetti. Médica Veterinária, CRMV-SP nº 11579, graduada em 1998 pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília. Em 2004 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal, foi bolsista da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) entre abril de 2003 e março de 2004. Iniciou o Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva em 2004, nessa mesma instituição. Em 2005 foi admitida por meio de concurso público da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, onde atualmente exerce o cargo de Pesquisador Científico junto à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), locada na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Araçatuba, Pólo Regional do Extremo Oeste.

“...É difícil crer na descoberta de um fato científico e divulgá-lo. Estudar durante dias, semanas e até mesmo anos, lutar contra si mesmo, fazer e refutar suas experiências. Mas quando se tem uma certeza, esta é uma das maiores alegrias que podem ser sentidas por uma alma humana. E a idéia de ter contribuído para a honra de seu país, torna esta alegria ainda mais profunda. Pois se a ciência não tem país, o cientista deve ter o seu país.”

Louis Pasteur

(durante a inauguração do INSTITUTO PASTEUR, em 1888)

Ao meu pai, José Carlos, pela presença constante
e por ter sido o grande incentivador de minha formação,
e a minha mãe Vera Lucia.
Com eterna gratidão,
OFEREÇO este trabalho.

Ao Alexandre, companheiro desta caminhada,
pelo estímulo e pelo apoio, e as minhas filhas,
Mária Luíza e Mária Clara,
pela compreensão da minha ausência

DEDICO

HOMENAGEM

*À minha família, pelo apoio incansável,
tornando assim possível a realização
de meu curso de Doutorado*

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho foram envolvidas muitas pessoas, contribuindo para que se pudesse atingir os objetivos. A todos que nos facultaram condições para vencer essa jornada, prestamos agradecimentos, especialmente:

Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, mestre e amigo, pela confiança, paciência, e pelos sábios ensinamentos na elaboração deste trabalho.

À Rosa M. Ferreira, grande amiga, pela dedicação nos ensinamentos recebidos e pelo constante apoio profissional.

À Profa. Tereza Cristina Cardoso, pelo valioso apoio na realização desse trabalho, pela amizade e pelo incentivo à pesquisa.

À Fabiana Nobrega, pela valiosa amizade, pelo companheirismo e pela força nos momentos difíceis.

À Adriana H. de Campos Nogueira e Clara Ferrari, pelo agradável convívio, amizade e pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Ao diretor do PRDTA do Extremo Oeste (APTA) João Demarchi, pelo constante apoio profissional, pelo incentivo e estímulo à pesquisa e pela sincera amizade.

Aos funcionários do PRDTA do Extremo Oeste (APTA), especialmente ao Adilson Marin, pela dedicação e inestimável colaboração na execução prática deste trabalho.

À Profa. Caris Nunes, pelas sugestões e pela colaboração na realização da dosagem de proteínas das toxinas.

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

À Isabel Pereira Matos (Biblioteca/Unesp/Araçatuba), pela presteza e dedicação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da FCAVJ-Unesp, da Área de Medicina Veterinária Preventiva, pela receptividade e pelos ensinamentos recebidos.

Aos colegas da Pós-Graduação: Fábio, Buchala, Tati, Alin, Luciano, Bruna e Guilherme, pelo adorável convívio e dias divertidos em Jaboticabal.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro) de Pedro Leopoldo–MG, pelo fornecimento das antitoxinas, em especial ao Dr. Mauricio Carvalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp e à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pela oportunidade de crescimento profissional e científico proporcionada.

E a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

Tese redigida segundo as normas estabelecidas pelo Regulamento dos Programas de Pós-graduação da FCAV-Unesp de 22-08-2000, conforme disposto no Art. 45 (Parágrafo único), aprovado pela Congregação desta Unidade Universitária em 09/09/2001.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 OBJETIVOS.....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Vacinas antitoxinogênicas comerciais.....	9
4.2 Grupos experimentais.....	9
4.2.1 Vacas.....	9
4.2.2 Bezerros lactentes.....	10
4.2.3 Animais pós-desmama.....	10
4.3 Coleta de sangue.....	11
4.4 Teste de ELISA Indireto.....	11
4.5 Análise Estatística.....	13
5 RESULTADOS.....	15
5.1 Resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D: análise individual dos produtos comerciais.....	15
5.2 Resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D: análise dos agrupamentos dos produtos comerciais bivalentes ou polivalentes..	19
5.3 Resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D: análise da imunidade passiva em bezerros.....	21
5.4 Resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D: análise dos grupos de acordo com a faixa etária.....	25
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÕES.....	31
8 REFERÊNCIAS.....	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores médios da resposta humoral (DO) para a toxina tipo C de bovinos vacinados com quatro produtos comerciais distintos, avaliados pelo teste de ELISA indireto até 342 dias após a vacinação primária.....	16
Tabela 2. Valores médios da resposta humoral (DO) para a toxina tipo D de bovinos vacinados com quatro produtos comerciais distintos, avaliados pelo teste de ELISA indireto até 342 dias após a vacinação primária.....	17
Tabela 3. Valores médios da resposta humoral (DO) para as toxinas tipos C e D, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes e polivalentes, avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.....	19
Tabela 4. Valores médios (DO) de anticorpos maternos para a toxina tipo C, de bezerros avaliados pelo teste de ELISA indireto até os 90 dias de vida.....	22
Tabela 5. Valores médios (DO) de anticorpos maternos para a toxina tipo D, de bezerros avaliados pelo teste de ELISA indireto até os 90 dias de vida.....	22
Tabela 6. Coeficiente da correlação linear entre os dia da vacinação das mães e o nascimento dos bezerros, para os tipos C e D.....	24
Tabela 7. Valores médios da resposta humoral (DO) para as toxinas botulínicas tipos C e D de bovinos vacinados e avaliados 30 dias após o reforço segundo a faixa etária e o tipo de toxina.....	26

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo C, em bovinos vacinados com quatro diferentes toxóides botulínicos comerciais (vacina 1, 2, 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.....	18
Figura 2. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo D, em bovinos vacinados com quatro diferentes toxóides botulínicos comerciais (vacina 1, 2, 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.....	18
Figura 3. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo C, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.....	20
Figura 4. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo D, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.....	20
Figura 5. Imunidade passiva para a toxina botulínica tipo C em bezerros até os 90 dias de vida, avaliada pelo teste de ELISA.....	23
Figura 6. Imunidade passiva para a toxina botulínica tipo D em bezerros até os 90 dias de vida, avaliados pelo teste de ELISA.....	23
Figura 7. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) para a toxina botulínica tipo C, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R^2).....	24

Figura 8. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) para a toxina botulínica tipo D, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.....	25
Figura 9. Representação gráfica dos valores médios da resposta humoral de bovinos vacinados com toxóide botulínico bivalente C e D nas diferentes faixas etárias, avaliados pelo teste de ELISA indireto 30 dias após a dose reforço.....	26

RESPOSTA HUMORAL DE BOVINOS PARA OS TOXÓIDES BOTULÍNICOS C E D

RESUMO – Foi avaliado pelo teste de ELISA indireto a resposta humoral para as toxinas botulínicas tipos C e D em animais vacinados com quatro diferentes produtos comerciais. Empregou-se duas vacinas bivalentes C e D (vacina 1 e vacina 2) e duas polivalentes contendo ainda os toxóides botulínicos tipos C e D (vacina 3 e vacina 4). Para análise foram realizadas seis colheitas de sangue ao longo do experimento, nos dias 0, 42, 75, 160, 250 e 342 após a vacinação. A imunidade passiva em bezerros até os 90 dias de idade, filhos de mães vacinadas com diferentes toxóides comerciais foram avaliados em 75 bezerros, agrupados de acordo com a vacina utilizada na mãe (B1, B2, B3 e B4). Para análise foram realizadas 3 colheitas de sangue, nos dias 5 (\pm 2), 45 e 90 dias após o nascimento. A avaliação da resposta humoral de bovinos vacinados em diferentes faixas etárias também foi realizada empregando-se uma vacina antbotulínica bivalente (C e D) comercial. Para análise, 90 bovinos foram divididos em 3 grupos de acordo com a faixa etária; animais com idade inferior a 2 anos, entre 2 e 5 anos e superior a 5 anos. Na avaliação da resposta humoral de animais vacinados com quatro diferentes produtos comerciais, para a toxina tipo C, as vacinas 1, 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas aos 42 dias da primeira dose. Aos 75 dias, a vacina 1, foi superior às vacinas 3 e 4, induzindo maior produção de anticorpos nos animais, porém não diferiu da vacina 2. Aos 160 dias houve queda na quantidade de anticorpos em todos os grupos, não havendo mais diferenças significativas entre as quatro vacinas testadas. Para a toxina tipo D, aos 42 dias da vacinação, não houve diferenças significativas entre as vacinas 1, 2 e 4, que apresentaram neste momento, valores superiores a vacina 3. No entanto, quando avaliadas aos 75 dias, a vacina 1 apresentou maior produção de anticorpos, diferindo significativamente das outras vacinas. Aos 160 dias da vacinação, os grupos de animais vacinados já não apresentavam diferenças significativas entre si. Na comparação da resposta humoral de bovinos vacinados com toxóides bivalentes e polivalentes, para a toxina tipo C, as vacinas bivalentes (1 e 2) foram superiores aos 75 dias após a vacinação, com diferença significativa neste momento ($p < 0,05$). Para a toxina tipo D, as vacinas bivalentes foram superiores em quase todo o período de

monitoramento (342 dias), exceto aos 160 dias, quando estatisticamente não diferiu das vacinas polivalentes. A imunidade passiva em bezerros, quando avaliada aos 7 dias de vida, os grupos B1, B2, B3 e B4 não apresentaram diferenças significativas na concentração de anticorpos maternos para as toxinas tipos C e D, independente das vacinas empregadas na imunização das mães. Posteriormente, a redução dos anticorpos passivos nos bezerros foi significativa aos 90 dias de idade, alcançando valores médios que não diferiram dos valores determinados no lote do controle. Quando comparada a resposta humoral de bovinos vacinados em diferentes idades, os animais com idade acima de cinco anos apresentou valores de anticorpos estatisticamente superiores aos outros grupos, tanto para a toxina tipo C quanto para a toxina tipo D. Os resultados do presente estudo ampliam os conhecimentos sobre esta importante questão de sanidade animal e apresentam importantes subsídios para a execução de programas de vacinação contra o botulismo e para a fabricação de produtos biológicos.

Palavras-Chave: botulismo, bovinos, resposta humoral, vacina, ELISA.

ABSTRACT – To compare the efficiency of an “in house” ELISA test, standardized to measure antibody C and D from *Clostridium botulinum*, a survey to analysis four different commercial vaccines was conducted. The vaccines used were two commercial, bivalent botulinum containing subtypes C and D (vaccine 1 and vaccine 2) and other two polyvalent including subtypes C and D. The first trial was blood samples taken at 0, 42, 75, 160, 250 and 342 days after vaccination, whereas the booster was performed at day 42. The second trial, maternal antibodies were also measured taken blood samples from 1-3 months age steers obtained from vaccinated heifers with the same vaccines described above, and divided into four different groups (B1, B2, B3, B4). The blood samples were taken at days 5, 45 and 90 after birth. Third and last trial was humoral response from vaccinated cattle with different age evaluation performed using the commercial *Clostridium botulinum* vaccine subtype C and D. For this purpose, 90 animals never vaccinated, were divided into 3 groups: 1 - ≤ 2 years old; 2 – animals aged between 2 and 5 years old; 3 – animals ≥ 5 years old. The blood samples were taken 30 days after vaccination after second dose of the vaccine. From the first trial, no significant difference was observed when subtype C was search in sera from animals at 42 days after vaccination. However, at 75 days after vaccination, vaccine 1 was able to induce higher levels of antibodies when compared to vaccine 3 and 4. The antibody level was declining after 160 days post vaccination. For subtype D antigen, at 42 days after vaccination, no differences could be observed. However, at 75 day after vaccination, higher levels of antibodies were observed from animals vaccinated with vaccine 1. Comparing the bivalent vaccines, these were able to induce higher antibodies levels at 75 days after vaccination (toxoid C). In addition, the same bivalent vaccines (toxóide D), inducing higher levels of antibodies until 342 days after vaccination. Regarding to maternal antibodies, at 7 day after birth, no differences were observed in all groups studied. At 90 days after birth, the respective antibodies were lower as observed from control group levels. The results from the last trial, animals ≥ 5 years old were able to produce higher levels of antibodies for both C and D toxin, 30 days after second dose. Finally, these results suggested new measures to be employed in sanitary programs, with better efficiency to produce new biological products.

Keywords: Botulism, bovine, humoral response, vaccine, ELISA.

1 INTRODUÇÃO

O botulismo em bovinos é uma doença de grande importância econômica e sanitária, sendo uma das principais causas de morte em animais adultos no Brasil. A enfermidade é causada pela ingestão da toxina tipo C ou D produzida pelo *Clostridium botulinum*, e sua ocorrência está relacionada principalmente ao manejo inadequado e à alta contaminação ambiental pelos esporos da bactéria. Os surtos de intoxicação botulínica geralmente estão associados à osteofagia, ao uso de alimentos contaminados e conservados inadequadamente, ou ainda pela veiculação hídrica.

Algumas medidas são adotadas para o controle da enfermidade, entre elas a suplementação mineral adequada às exigências nutricionais de cada categoria animal, a retirada de cadáveres de animais das pastagens e os cuidados com a água de dessedentação e conservação dos alimentos. Entretanto, a vacinação com toxóides botulínicos C e D de boa qualidade é a principal medida de prevenção da doença, principalmente nos sistemas de criação extensiva, devido às dificuldades operacionais em realizar as medidas sanitárias. Das propriedades rurais onde ocorreram surtos de botulismo associado à osteofagia, entre os anos de 1989 e 2000, 95,79% não haviam vacinado os animais.

No Brasil, as normas para produção e controle das vacinas foram instituídas em 1992, pela Portaria Nº 49 do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Atualmente, estão regulamentadas pela Instrução Normativa Nº 23, de 18/03/2002, que estabelece títulos mínimos de 5 UI/mL para a antitoxina C e 2 UI/mL para a antitoxina D, para a sua comercialização. Contudo, não existem informações sobre o grau de imunidade necessária para proteger os animais expostos ao material tóxico, já que no campo não é conhecida a quantidade de toxina ingerida pelos animais.

Nos últimos anos houve um grande aumento na produção de vacinas contra o botulismo e demais clostridioses, em face dos significativos danos e prejuízos econômicos causados por essas doenças.

Com a comercialização de aproximadamente 45 milhões de doses anuais contra o botulismo¹, o presente estudo propôs avaliar, pelo teste de ELISA indireto, a resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D, visando contribuir para ampliação dos conhecimentos sobre esta importante questão para a sanidade animal, para subsidiar a implantação de programas de controle, além de grande valia para a indústria de produtos biológicos.

¹ CARVALHO FILHO, M. B. Laboratório Nacional Agropecuário/LANAGRO. Comunicação Pessoal, 2007.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O botulismo bovino é uma intoxicação resultante da ingestão de matéria orgânica decomposta, animal ou vegetal, contendo toxina tipo C ou D produzida pelo *Clostridium botulinum* (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Pode acometer bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, asininos, muares e raramente suínos. O homem e outras espécies animais como cão, marta, aves domésticas e silvestres, animais de laboratório e peixes também são suscetíveis (SMITH & SUGIYAMA, 1988).

A enfermidade é cosmopolita, descrita em todos os continentes (ACHA & SZIFRES, 1986), mas com variação geográfica na distribuição dos tipos de toxina envolvidos com o botulismo bovino.

Os esporos do microrganismo são encontrados ubiqüitariamente no solo, na água, no material orgânico animal e vegetal, em conservas alimentares e no trato digestivo do homem e dos animais. Sob condições de anaerobiose e temperatura favoráveis, a bactéria se multiplica e produz a toxina altamente letal (SMITH, 1977).

As neurotoxinas produzidas pelo *C. botulinum* são classificadas em sete tipos sorologicamente distintos que possuem, no entanto, ação farmacológica semelhante. As toxinas A, B, E e F são freqüentemente responsáveis pelo botulismo humano (ACHA & SZYFRES, 1986) enquanto as toxinas C e D causam o botulismo nos animais (SMITH & SUGIYAMA, 1988). A toxina G foi isolada na Argentina, sendo associada à ocorrência de intoxicações naturais em seres humanos (GIMÉNEZ & CICCARELLI, 1976).

A toxina é absorvida pela corrente sanguínea e transportada até os neurônios. Atua no sistema nervoso, bloqueando a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos, causando paralisia flácida progressiva nos músculos. A eventual morte do animal ocorre devido à parada respiratória (SMITH & SUGIYAMA, 1988).

Nos bovinos o quadro clínico é dependente da quantidade de toxina ingerida pelo animal. Desta forma, a intoxicação botulínica pode apresentar-se nas formas superaguda, aguda, subaguda e crônica, tendo como base o desenvolvimento da

paralisia em diferentes grupos musculares e a gravidade do quadro clínico (THEILER & ROBINSON, 1927).

Dados epidemiológicos mostram maior incidência da doença em fêmeas adultas prenhes ou lactantes e com maior frequência sazonal registrada na época das chuvas, fato este explicado pela maior exigência nutricional nesta categoria animal e pela dificuldade na suplementação mineral nessa época (LISBOA et al., 1996; DUTRA, 2001).

No Brasil, o botulismo em bovinos foi diagnosticado pela primeira vez por TOKARNIA et al. (1970) no Estado do Piauí. Os autores relacionaram a morte de aproximadamente 15.000 animais, de um total de 100.000 animais existentes na região, à presença de carcaças de animais nas pastagens e à osteofagia observada na ocasião. A osteofagia, que os animais adquirem quando mantidos em áreas deficientes de fósforo (TOKARNIA et al., 1970; LANGENEGGER & DÖBEREINER, 1980; TOKARNIA et al., 1988), sem a adequada suplementação mineral, e com a presença nas pastagens de restos de cadáveres contaminados por *C. botulinum* tem sido a principal causa de surtos da doença.

A ocorrência da intoxicação não associada à osteofagia tem sido registrada esporadicamente. No Estado do Maranhão, LANGENEGGER & DÖBEREINER (1988) descreveram surtos de botulismo de origem hídrica em búfalos. Surtos associados à ingestão de água de cacimba contaminada também foram registrados por DUTRA et al. (2001). Alimentos contaminados e conservados inadequadamente também podem eventualmente estar envolvidos com a intoxicação botulínica, como a ingestão de cama de frango, silagem e milho (DUTRA, 2001; DUTRA et al., 2005).

O diagnóstico do botulismo é basicamente feito pelo histórico (ausência de vacinação, osteofagia e existência de cadáveres na pastagem), pelo quadro clínico-patológico e pela demonstração da toxina botulínica em amostra biológica colhida de animal enfermo (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

O bioensaio em camundongo e a soroneutralização com antitoxinas padrões homólogas são os testes aceitos internacionalmente para titulação e tipificação das toxinas botulínicas (SMITH, 1977), porém esses testes apresentam algumas limitações

de questões éticas, pois são realizadas *in vivo* e requerem o uso de grande número de animais.

A tentativa de detecção da toxina botulínica apresenta complexidades, como a alta susceptibilidade dos bovinos e o fato de que a toxina, uma vez tendo agido na sinapse neuromuscular, perde a sua atividade biológica, impossibilitando a sua detecção, mesmo com o uso de técnicas de alta sensibilidade (DUTRA et al., 1993).

A sensibilidade da soroneutralização em camundongo no diagnóstico laboratorial do botulismo bovino foi de 43 %, quando realizado análises de materiais provenientes de animais com quadro clínico, patológico e epidemiológico da enfermidade (DUTRA, 2001)

WEISS & WEISS (1988) empregaram o teste de fixação de complemento e consideraram o teste rápido e com boa sensibilidade. THOMAZ (1991) comparou o ensaio imunoenzimático (ELISA) com a soroneutralização na tentativa de detecção de toxinas C e D e verificou sensibilidade de 70% e especificidade de 96%. ELLIS et al. (1999) também observaram uma boa correlação entre os dois ensaios para mensurar a concentração de toxina botulínica tipo C e D em forma de toxóide.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido para detectar e/ou monitorar anticorpos contra toxina botulínica em rebanhos vacinados com toxóides tipos C e D e investigar a freqüência da enfermidade nos rebanhos. Segundo GREGORY et al. (1996), o teste de ELISA indireto foi eficaz, com alta reatividade, estimando-se a proporção de animais expostos ou não à enfermidade, principalmente em áreas endêmicas.

Nos países onde a enfermidade oferece riscos, o controle foi realizado adotando-se medidas como a imunização ativa dos animais (TAMMEMAGI & GRANT, 1967; JANSEN et al., 1976), principalmente nos sistemas de criação extensiva (DÖBEREINER et al., 1992). Além disso, a prevenção de surtos de intoxicação botulínica associados à osteofagia, a correção da deficiência de fósforo e a retirada das fontes de contaminação das pastagens junto à vacinação são de fundamental importância (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Segundo DUTRA (2001), 95,79% das

propriedades rurais onde ocorreram surtos de botulismo associado à osteofagia, entre os anos de 1989 e 2000, não haviam vacinados os animais.

LOBATO (1989) avaliou a eficiência dos imunógenos antitoxínicos bivalentes C e D comercializados no Brasil no período de 1986-1989 e nenhum dos produtos atendia satisfatoriamente as exigências mínimas de antitoxinas séricas C e D para a imunização dos bovinos. Nesse período não havia programas de controle da produção de vacinas no Brasil.

Em 1996, DUTRA & DÖBEREINER avaliaram a eficácia de uma vacina botulínica bivalente C e D de origem australiana na prevenção da doença em uma propriedade rural com histórico epidemiológico, clínico-patológico e laboratorial de botulismo. Durante um ano de observação e com a ausência de outras medidas específicas para o controle do botulismo, os resultados foram de 31 mortes de animais não vacinados e apenas uma entre os vacinados, demonstrando a eficácia da vacina bivalente mesmo em situação de alto desafio.

Recentemente, STEINMAN et al. (2006) avaliando surtos da enfermidade em animais vacinados entre os anos de 2002 e 2006, verificaram que as fêmeas com menos de três parições ou nulíparas foram as mais afetadas, enquanto as múltíparas demonstraram maior resistência à intoxicação devido ao número de inoculações vacinais que receberam em anos anteriores. Em análise de riscos, levando em consideração a epidemiologia, tempo de exposição e as fontes de intoxicação encontradas nas propriedades, foi observada a probabilidade de 96% de animais não vacinados, de 6 a 24 meses de idade, serem acometidos pela enfermidade, e 24% em animais com idade de 2 a 6 meses, provavelmente protegidos por anticorpos maternos. Segundo os autores, os toxóides utilizados conferiram uma proteção adequada contra a exposição natural, porém o protocolo de vacinação ao rebanho leiteiro deveria ser otimizado para aquela população animal.

A avaliação da imunogenicidade dos toxóides C e D pela soroneutralização em camundongos, quando comparadas por LOBATO et al. (1999), mostrou que a vacinação com toxóides botulínicos bivalentes C e D foi menos eficiente que no emprego de toxóides monovalentes. Maiores concentrações de anticorpos foram

observados duas semanas após as doses de reforço para as vacinas monovalentes C (9,8 UI/mL) e D (8,4 UI/mL) quando comparada com a bivalente C e D (6 UI/mL para C e 7 UI/mL para D, respectivamente).

Na Austrália, BROWN et al. (1999) compararam a imunogenicidade de duas vacinas bivalentes C e D pelo teste de ELISA. Seis meses após a vacinação dos animais com dose única da Websters Singvac (vacina contendo um óleo não mineral como adjuvante) e da CSL (vacina convencional), a Singvac produziu resposta imune duas vezes maiores que a CSL. Contudo, essa diferença foi evidenciada apenas contra a toxina tipo C, e ambas as vacinas produziram títulos similares de anticorpos contra o tipo D. Nesse trabalho, os autores também puderam verificar a alta concentração de anticorpos contra o tipo C e D nas desmamas de bezerrosantes da vacinação e associaram esses resultados à imunidade passiva, pois as mães haviam sido vacinadas em várias ocasiões.

A resposta humoral de cobaios e bovinos vacinados com três diferentes toxóides antitubulínicos bivalentes tipos C e D, comercializados no Brasil, foi comparada por FONSECA (2001). Segundo o autor, ocorreram diferenças significativas na produção de anticorpos pelas diferentes vacinas avaliadas, principalmente contra o tipo C. Os resultados também demonstraram que os cobaios, animais de laboratório utilizados para as provas de potência de toxóides antitubulínicos no país, apresentaram uma resposta imune significativamente maior que os bovinos.

QUEIROZ (2001) descreveu o desenvolvimento de um teste de ELISA indireto, verificando elevado grau de especificidade e sensibilidade para a detecção de anticorpos contra as toxinas C e D de *C. botulinum*. Na ocasião, a autora observou diferenças significativas na produção de anticorpos tanto contra a toxina tipo C, como contra a toxina tipo D, em bovinos vacinados com toxóides comerciais.

Variações na resposta humoral de ovinos vacinados com toxóides botulínicos C e D comerciais também foi avaliada por NOBREGA (2007). Pelo teste de ELISA indireto, as vacinas produziram elevado grau de anticorpos, permanecendo até os seis meses após a vacinação, porém com diferença significativa na resposta imune entre as vacinas testadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D.

3.2 Específicos

- Avaliar durante o período de 342 dias (dias 0, 42, 75, 160, 250 e 342), a resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D, vacinados com diferentes produtos comerciais;
- Comparar a resposta humoral de bovinos vacinados com toxóides bivalentes e polivalentes comerciais;
- Avaliar a imunidade passiva em bezerros até os três meses de idade, filhos de mães vacinadas com diferentes toxóides comerciais;
- Avaliar a resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D, quando vacinados com toxóide bivalente comercial em diferentes idades.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vacinas antitoxigênicas comerciais

Foram adquiridas no comércio quatro vacinas antitoxigênicas de diferentes fabricantes em uso no Brasil, sendo duas vacinas bivalentes (contendo toxóides botulínicos C e D) e duas vacinas polivalentes (contendo toxóides botulínicos C e D e outros inóculos contra as demais Clostridioses) adsorvidas em hidróxido de alumínio. A aquisição foi realizada em períodos e com partidas diferentes, observando-se a conservação e o prazo de validade.

4.2 Grupos experimentais de bovinos

4.2.1 Vacas

Cem vacas adultas (Nelores), pertencentes a uma propriedade rural com histórico clínico e epidemiológico de botulismo e sem registro de vacinação nos últimos dois anos, foram agrupadas em 5 grupos de 20 animais. Quatro grupos foram vacinados, sendo os grupos vacina 1 e vacina 2 com vacinas bivalentes, e os grupos vacina 3 e vacina 4 com vacinas polivalentes. O grupo controle não foi vacinado. A revacinação (2ª dose) dos bovinos foi efetuada 42 dias após o estímulo primário (FONSECA, 2001), utilizando-se a via subcutânea e a dose recomendada pelo fabricante (5 mL).

Os grupos permaneceram, durante o experimento, na unidade de origem (Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios (PRDTA) do Extremo Oeste, Andradina – SP) devidamente identificados e em sistema de criação extensiva.

Seis colheitas de sangue (4.3) dos animais foram realizadas de livre arbítrio ao longo do experimento: nos dias zero (início do experimento), 42, 75, 160, 250 e 342 após a vacinação.

4.2.2 Bezerros lactentes

Foram utilizados 75 bezerros, de ambos os sexos, da raça Nelore, sendo 63 filhos de mães vacinadas com quatro diferentes toxóides comerciais contra as toxinas botulínicas tipos C e D e 12 que nasceram de mães não vacinadas caracterizando o grupo controle neste experimento. O primeiro lote de animais foi agrupado de acordo com a vacina inoculada na mãe (4.2.1), ou seja, os bezerros nascidos do grupo vacina 1 formaram o grupo B1, os nascidos do grupo vacina 2 formaram o grupo B2 e assim sucessivamente.

A estação de parição durou 3 meses, iniciando-se 40 dias após a revacinação das vacas (mães). Os animais foram mantidos em sistema de criação extensiva e devidamente identificados no dia do nascimento. Para as análises, 3 colheitas de sangue (4.3) dos bezerros foram realizadas, nos dias 7 (± 2), 45 e 90 após o nascimento.

4.2.3 Animais Pós-desmama

Foram vacinados 90 bovinos, de ambos os sexos, da raça Nelore, sem histórico de vacinação prévia, pertencentes à Unidade de Pesquisa da Faculdade de Engenharia, Unesp, *Campus* de Ilha Solteira, onde surtos de botulismo já haviam ocorrido em anos anteriores. Os animais foram agrupados de acordo com a faixa etária, formando 3 grupos ($n=30$); animais com idade inferior a 2 anos, entre 2 e 5 anos e superior a 5 anos.

Foi empregada uma vacina bivalente C e D (vacina 2) utilizando-se a via subcutânea e a dose recomendada pelo fabricante (5 mL). A revacinação (2ª dose) foi efetuada 42 dias após o estímulo primário (FONSECA, 2001) e as colheitas de sangue (4.3) foram realizadas nos dias zero (início do experimento), 42 e 72 após a vacinação.

4.3 Colheita de sangue

As colheitas foram realizadas por punção da veia jugular com a utilização de tubos Vacuntainer[®]. As amostras permaneceram em repouso à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo e posteriormente foram centrifugadas para a obtenção do soro sanguíneo e mantidas a -20°C até a utilização no teste sorológico.

4.4 Teste de ELISA Indireto

As amostras de soro sanguíneo dos bovinos foram submetidas individualmente e em duplicata à detecção de anticorpos contra as toxinas botulínicas tipos C e D pelo teste de ELISA indireto seguindo a metodologia descrita por GREGORY et al. (1996), com algumas modificações.

Para a produção e semipurificação do antígeno a ser utilizado no teste de ELISA, cepas de *C. botulinum* tipos C e D, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Pesquisas em Enfermidades Infecciosas dos Animais, Unesp-Araçatuba, foram semeadas em balões de cultura (1.000 mL) contendo meio *Cooked Meat Medium* (CMM). Após a inoculação, o meio de cultura foi aquecido em banho-maria a 80°C por 10 minutos para eliminação dos contaminantes e ativação dos esporos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, os tubos foram levados para a estufa bacteriológica e mantidos à temperatura de 37°C por um período de 5 a 7 dias. O sobrenadante da cultura foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos e filtrado em Millipore ($0,45\ \mu\text{m}$).

A presença das toxinas e sua toxicidade foram avaliadas pelo bioensaio em camundongo, inoculando-se em camundongos 0,5 mL do sobrenadante da cultura por via intraperitoneal. Os camundongos inoculados foram observados por um período de 3 dias, para a verificação de sinais clínicos sugestivos do botulismo: respiração ofegante, incoordenação motora, dificuldade de andar, “abdômen de vespa”, asfixia e morte. A identificação dos tipos de *C. botulinum* pela soroneutralização em camundongo foi

realizada de acordo com os procedimentos descritos por DOWELL & HAWKINS (1974), utilizando-se antitoxinas homólogas obtidas do “Center for Disease Control”, Atlanta, Geórgia, Estados Unidos da América.

As frações líquidas colhidas da cultura foram centrifugadas (HERMLE Z513K) a 2.000 g, a 4°C, por 30 minutos, e precipitadas em sulfato de amônio (380g/L), sob a temperatura de 4°C, por 12 horas. Posteriormente, após a centrifugação a 5.000 g, a 4°C por 30 minutos, o sedimento foi ressuspensão em Tris-EDTA. Esse procedimento foi repetido três vezes, e o material dialisado em sacos de diálise imersos em Solução Tamponada de Fosfato (PBS), pH 7,4, por 4 dias.

A concentração de proteína total, 6,7 mg/ml para a toxina C e 4,4 mg/mL para a toxina D, foi determinada pelo kit comercial, pelo método colorimétrico do ácido biciconínico (BCA) (PIERCE®).

As diluições do antígeno e dos soros testes para a execução do ELISA foram estabelecidas pela prévia diluição seriada dos soros controles positivos e negativos. Dessa forma, foram escolhidas as diluições que ofereceram a melhor discriminação entre os respectivos soros.

O soro controle negativo utilizado na padronização e posteriormente como controle nas placas dos testes foi obtido de bezerros privados de colostro ao nascimento, e o soro controle positivo, contendo 5UI/mL de anti-C e anti-D, foi gentilmente cedido pelo Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro/MG) de Pedro Leopoldo.

As placas de poliestireno de 96 cavidades (NUNC, Denmark) foram sensibilizadas (100µL/cavidade) com o antígeno diluído 1:200 para o tipo C e 1:10 para o tipo D em tampão carbonato-bicarbonato (TCB), pH 9,6, e incubadas a 4°C em câmara úmida por 12 horas. Após cinco lavagens com PBS-T (0,1%), pH 7,4, as placas foram bloqueadas (200µL/cavidade) com leite em pó desnatado a 15%, diluído em TCB, e incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora.

Após as seqüências de lavagens, como descrito anteriormente, foram adicionados (50 µL/cavidade) os soros dos animais, diluídos em PBS acrescido de 15% de leite em pó desnatado, na diluição 1:200 para analisar o tipo C e 1:5 para analisar o

tipo D. Em seguida, foi realizada nova seqüência de lavagens com PBS-T (0,1%), pH 7,4, e adicionou-se então (100 µL/cavidade) o conjugado imunoenzimático comercial (SIGMA®), antiimunoglobulina bovina conjugada com peroxidase, na diluição de 1:6.000 (de acordo com o fabricante) em PBS-T acrescido de 15% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, em câmara úmida.

Após as lavagens das placas, o substrato Orto-fenileno-diamina (OPD), acrescido de H₂O₂ a 3%, foi diluído em tampão citrato-fosfato, pH 4,5, e adicionado (100 µL/cavidade) às placas, por 15 minutos, em temperatura ambiente, livre da luz solar. A reação foi interrompida com HCl 2M (50µL/cavidade) e avaliada em densidade óptica (DO) pela leitora de microplacas de ELISA (Labsystem – Multiskan EX®) em filtro de 492 nm.

Para a interpretação do teste foi utilizada a seguinte fórmula: $Y = \frac{XA - XN}{XP - XN}$; onde, Y é o valor final em absorbância do soro teste, XA é a média da densidade óptica (DO) do soro teste e XN e XP são, respectivamente, as médias das DOs dos soros controles negativos e positivos.

4.5 Análise Estatística

Na avaliação e comparação da resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D, vacinados com diferentes produtos comerciais contendo toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), os dados foram transformados em log (x+1) e submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e a homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

O mesmo teste foi empregado para analisar a imunidade passiva em bezerros até os três meses de idade, além de análise de correlação e regressão dos valores de

anticorpos maternos (densidade óptica) contra as toxinas botulínicas tipos C e D, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.

Na avaliação da resposta humoral de bovinos vacinados com toxóide botulínico bivalente C e D nas diferentes faixas etárias, os dados foram transformados em $\log(x+1)$ e submetidos à análise de variância e análise dos resíduos para verificar a normalidade e a homogeneidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

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

5 RESULTADOS

5.1 Resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D: análise individual dos produtos comerciais

Os valores médios da resposta humoral de bovinos vacinados com quatro produtos comerciais, avaliado pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos, são apresentados nas Tabelas 1 e 2, e a representação gráfica ao longo de todo período de monitoramento (aproximadamente um ano) está registrada nas Figuras 1 e 2.

Para a toxina tipo C, as vacinas 1, 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas na resposta humoral ($p>0,05$), quando avaliadas 42 dias após a vacinação. Aos 75 dias, a vacina 1, que corresponde a uma das vacinas bivalentes, foi superior às vacinas 3 e 4, induzindo maior produção de anticorpos nos animais, porém, não diferiu estatisticamente da vacina 2 (bivalente).

Quando avaliados aos 160 dias, houve uma queda significativa na quantidade de anticorpos em todos os grupos vacinados, não havendo mais diferenças significativas entre as quatro vacinas testadas ($p>0,05$). Aos 250 dias, os quatro grupos vacinados apresentaram baixos valores de anticorpos e aos 342 estes valores não diferiram dos determinados no grupo controle.

Para a toxina tipo D, aos 42 dias da vacinação, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre as vacinas 1, 2 e 4, que apresentaram neste momento, valores superiores à vacina 3. Aos 75 dias, a vacina 1 apresentou maior indução de anticorpos, diferindo estatisticamente das outras vacinas ($p<0,05$). Contudo, quando avaliadas aos 160 dias, as vacinas já não apresentavam diferenças significativas na resposta humoral entre elas ($p>0,05$). Aos 250 dias, a vacina 4 foi inferior às vacinas 1, 2 e 3, que não diferiram estatisticamente entre si, enquanto aos 342 dias, a vacina 3 apresentou-se inferior às outras, não diferindo neste momento dos animais não vacinados (controle).

Tabela 1. Valores médios da resposta humoral (DO) para a toxina tipo C de bovinos vacinados com quatro produtos comerciais distintos, avaliados pelo teste de ELISA indireto até 342 dias após a vacinação primária

Dias	DOs Tipo C (Média \pm Desvio padrão)				
	Vacina 1	Vacina 2	Vacina 3	Vacina 4	Controle
0	0,086 \pm 0,108 ^{cdA}	0,076 \pm 0,057 ^{dA}	0,079 \pm 0,056 ^{cA}	0,073 \pm 0,069 ^{bA}	0,056 \pm 0,040 ^{bcA}
42	0,288 \pm 0,191 ^{bAB}	0,399 \pm 0,181 ^{bA}	0,413 \pm 0,238 ^{aA}	0,439 \pm 0,290 ^{aA}	0,129 \pm 0,099 ^{aB}
75	0,638 \pm 0,360 ^{aA}	0,526 \pm 0,217 ^{aAB}	0,349 \pm 0,189 ^{aB}	0,390 \pm 0,287 ^{aB}	0,066 \pm 0,105 ^{bcC}
160	0,153 \pm 0,129 ^{cAB}	0,198 \pm 0,107 ^{cA}	0,197 \pm 0,111 ^{bA}	0,177 \pm 0,157 ^{bA}	0,069 \pm 0,063 ^{bcB}
250	0,093 \pm 0,080 ^{cdAB}	0,061 \pm 0,031 ^{dBC}	0,110 \pm 0,073 ^{cAB}	0,142 \pm 0,085 ^{bA}	0,023 \pm 0,034 ^{cC}
342	0,066 \pm 0,085 ^{dB}	0,056 \pm 0,053 ^{dB}	0,131 \pm 0,092 ^{bcA}	0,113 \pm 0,049 ^{bAB}	0,085 \pm 0,062 ^{abAB}

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

Tabela 2. Valores médios da resposta humoral (DO) para a toxina tipo D de bovinos vacinados com quatro produtos comerciais distintos, avaliados pelo teste de ELISA indireto até 342 dias após a vacinação primária

Dias	DOs Tipo D (Média ± Desvio padrão)				
	Vacina 1	Vacina 2	Vacina 3	Vacina 4	Controle
0	0,053 ± 0,199 ^{da}	0,147 ± 0,192 ^{ca}	0,099 ± 0,144 ^{ca}	0,070 ± 0,162 ^{ca}	0,107 ± 0,032 ^{abA}
42	0,429 ± 0,212 ^{ba}	0,441 ± 0,173 ^{aA}	0,237 ± 0,128 ^{bBC}	0,304 ± 0,237 ^{abAB}	0,112 ± 0,019 ^{aC}
75	0,756 ± 0,342 ^{aA}	0,430 ± 0,119 ^{aB}	0,300 ± 0,158 ^{abbB}	0,468 ± 0,323 ^{aB}	0,116 ± 0,021 ^{bC}
160	0,332 ± 0,238 ^{bcA}	0,312 ± 0,150 ^{bA}	0,349 ± 0,193 ^{aA}	0,412 ± 0,202 ^{aA}	0,119 ± 0,022 ^{abB}
250	0,340 ± 0,275 ^{bcAB}	0,392 ± 0,186 ^{abA}	0,323 ± 0,238 ^{abAB}	0,237 ± 0,178 ^{bBC}	0,124 ± 0,024 ^{abC}
342	0,294 ± 0,231 ^{cAB}	0,416 ± 0,177 ^{abA}	0,241 ± 0,105 ^{bBC}	0,347 ± 0,236 ^{abAB}	0,127 ± 0,024 ^{abC}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, e maiúsculas diferentes, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

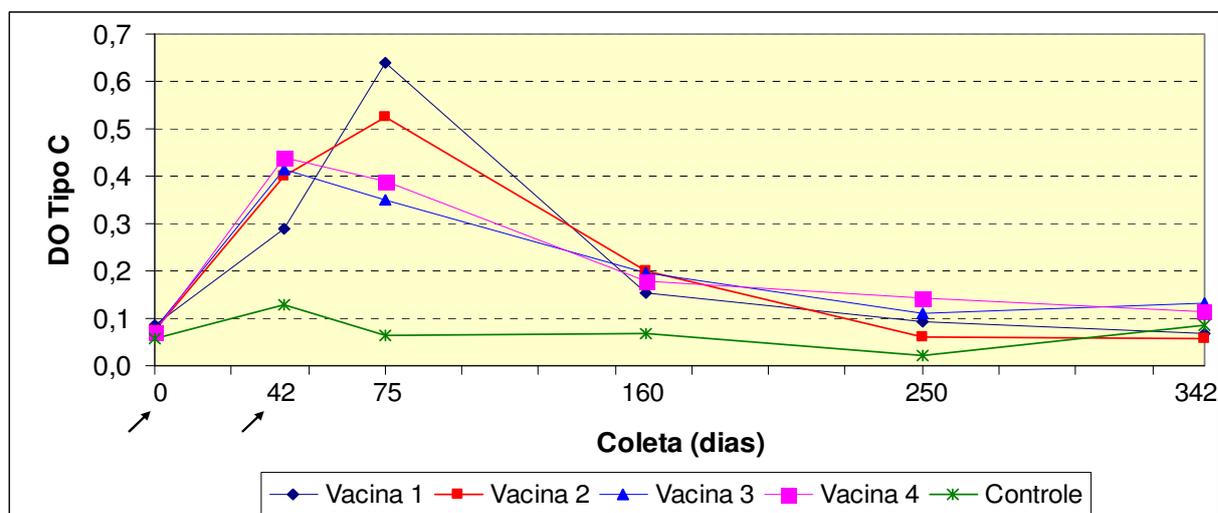


Figura 1. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo C, em bovinos vacinados com quatro diferentes toxóides botulínicos comerciais (vacina 1, 2, 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.

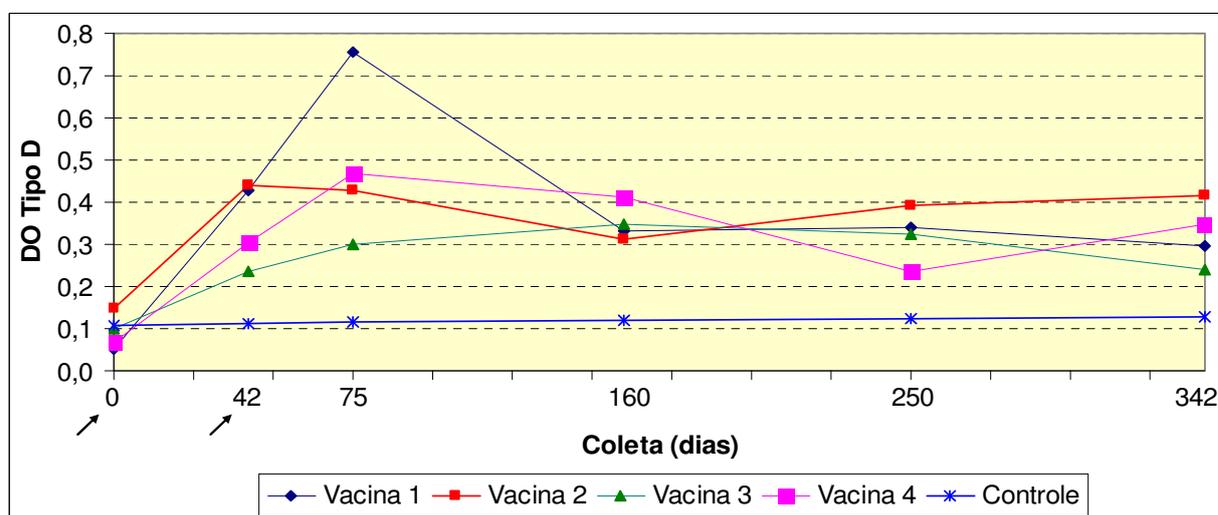


Figura 2. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo D, em bovinos vacinados com quatro diferentes toxóides botulínicos comerciais (vacina 1, 2, 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.

5.2 Resposta humoral de bovinos para as toxinas botulínicas tipos C e D: análise dos agrupamentos dos produtos comerciais bivalentes ou polivalentes

Na comparação da resposta humoral de bovinos vacinados com toxóides bivalentes e polivalentes, para a toxina tipo C, as vacinas bivalentes (1 e 2) foram superiores quando avaliadas aos 75 dias após a vacinação, com diferença significativa neste momento ($p < 0,05$), enquanto no final da avaliação, aos 342 dias, as vacinas bivalentes foram inferiores as polivalentes (3 e 4). Nos outros momentos avaliados, não houve diferença significativa entre elas.

Diferente situação ocorreu para a toxina tipo D. As vacinas bivalentes foram superiores em relação às polivalentes em quase todo o período de monitoramento (342 dias), com uma magnitude superior na resposta humoral, exceto aos 160 dias, quando estatisticamente não diferiu das vacinas polivalentes (Tabela 3). A representação gráfica da resposta humoral para as toxinas botulínicas tipos C e D, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), em diferentes momentos está registrada nas Figuras 3 e 4.

Tabela 3. Valores médios da resposta humoral (DO) para as toxinas tipos C e D, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes e polivalentes, avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos

Dias	Vacinas			
	Tipo C		Tipo D	
	Bivalente*	Polivalente	Bivalente	Polivalente
0	0,081 ± 0,086 A	0,069 ± 0,056 A	0,100 ± 0,198 A	0,080 ± 0,101 A
42	0,344 ± 0,192 A	0,325 ± 0,259 A	0,435 ± 0,191 A	0,221 ± 0,182 B
75	0,582 ± 0,298 A	0,256 ± 0,228 B	0,593 ± 0,302 A	0,276 ± 0,214 B
160	0,176 ± 0,119 A	0,146 ± 0,128 A	0,322 ± 0,196 A	0,282 ± 0,194 A
250	0,077 ± 0,062 A	0,089 ± 0,084 A	0,366 ± 0,233 A	0,215 ± 0,178 B
342	0,061 ± 0,070 B	0,106 ± 0,072 A	0,355 ± 0,212 A	0,226 ± 0,145 B

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na linha para cada tipo, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Médias das duas vacinas (bivalentes e polivalentes).

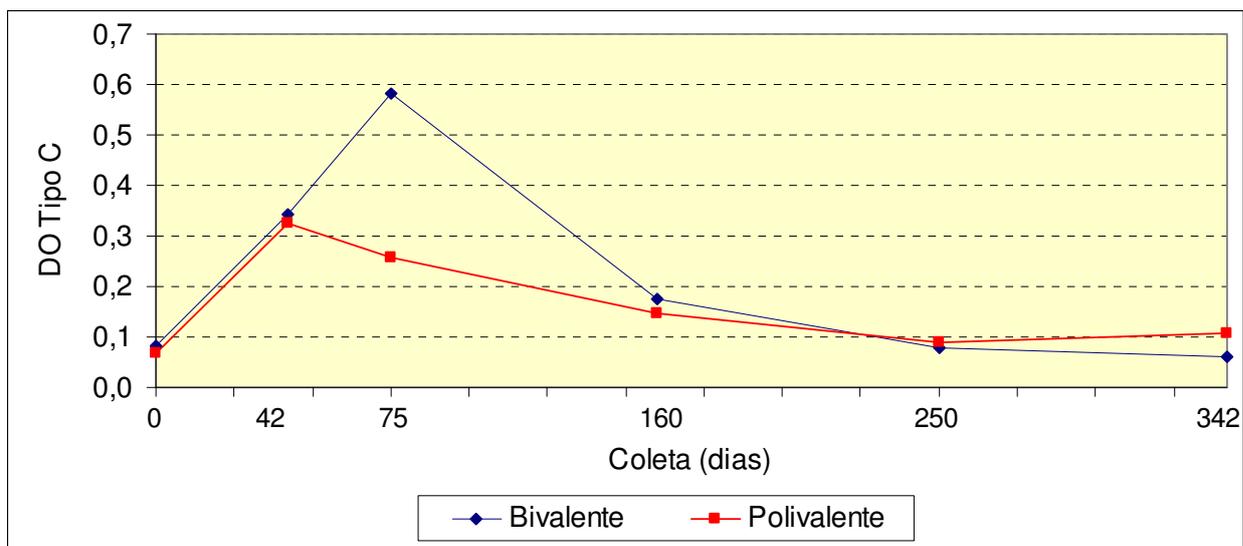


Figura 3. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo C, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.

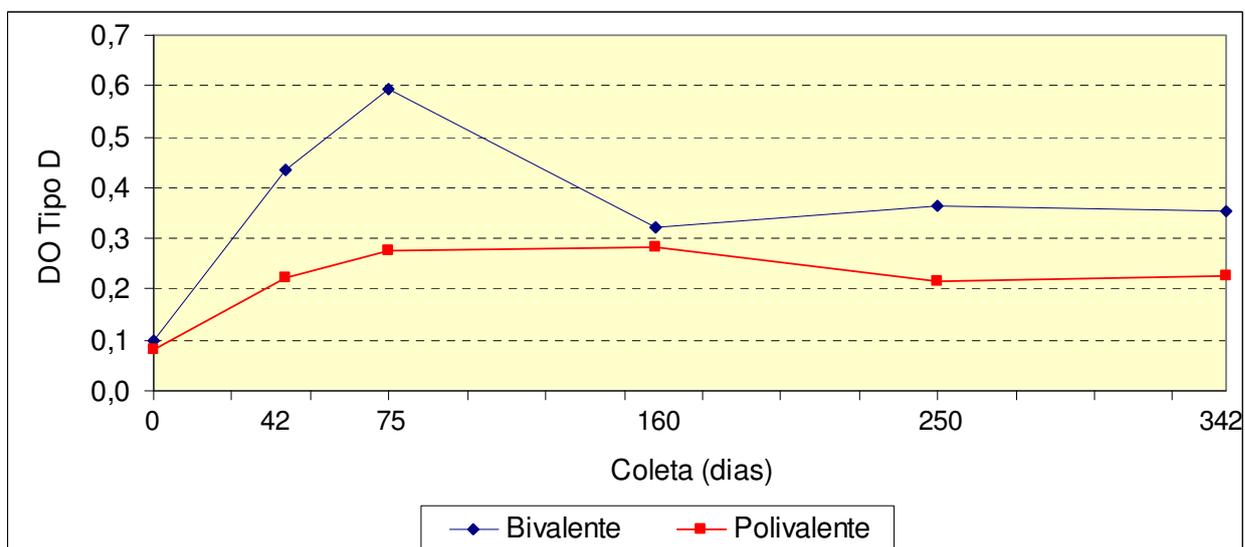


Figura 4. Resposta humoral para a toxina botulínica tipo D, de bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes (vacinas 1 e 2) e polivalentes (vacinas 3 e 4), avaliados pelo teste de ELISA indireto em diferentes momentos.

5.3 Resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D: análise da imunidade passiva em bezerros

Quando avaliada aos 7 (\pm 2) dias de vida, a concentração de anticorpos maternos para a toxina botulínica tipo C apresentada pelos grupos B1, B2, B3 e B4 foram similares, não apresentando diferença significativa ($p>0,05$). Quando avaliados aos 45 dias, os grupos B1, B3 e B4 não diferiram entre si, enquanto o grupo B2 não diferiu do grupo controle. Aos 90 dias de vida, houve uma redução significativa na concentração de anticorpos maternos, e os grupos não diferiram do grupo controle (Tabela 4 e Figura 3).

Em relação à toxina tipo D, também não houve diferença significativa entre os grupos B1, B2, B3 e B4 ($p>0,05$), quando avaliada a concentração de anticorpos de origem materna apresentados aos 7 (\pm 2) dias de vida. Aos 45 dias, a concentração de anticorpos foi similar estatisticamente entre os grupos B1, B2 e B3, diferindo do grupo B4 que se equiparou ao grupo controle. Aos 90 dias de vida, todos os grupos não diferiram do grupo controle (Tabela 5 e Figura 4).

Em análise dos valores obtidos pelos grupos aos 7 dias de vida, foi verificada uma correlação linear do espaçamento entre o dia da vacinação das mães e o dia do nascimento dos bezerros. À medida que passou mais tempo da vacinação das mães até o parto, menor foram os valores de anticorpos de origem materna detectados nos bezerros (Tabela 6). No entanto essa correlação ocorreu apenas para o tipo C. A representação gráfica da correlação linear entre o dia da vacinação das mães e o dia do parto está registrada nas Figuras 5 e 6.

Tabela 4. Valores médios (DO) de anticorpos maternos para a toxina tipo C, de bezerros avaliados pelo teste de ELISA indireto até os 90 dias de vida

Grupo	DO Tipo C (Média ± Desvio padrão)		
	Dias de vida		
	7	45	90
B1	0,239 ± 0,114 ^{aA}	0,059 ± 0,047 ^{abB}	0,016 ± 0,032 ^{aB}
B2	0,210 ± 0,140 ^{aA}	0,028 ± 0,030 ^{bB}	0,018 ± 0,030 ^{aB}
B3	0,152 ± 0,119 ^{abA}	0,055 ± 0,077 ^{abB}	0,026 ± 0,048 ^{aB}
B4	0,238 ± 0,107 ^{aA}	0,085 ± 0,064 ^{aB}	0,023 ± 0,045 ^{aC}
Controle	0,069 ± 0,075 ^{ba}	0,017 ± 0,011 ^{bB}	0,007 ± 0,021 ^{aB}

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

Tabela 5. Valores médios (DO) de anticorpos maternos para a toxina tipo D, de bezerros avaliados pelo teste de ELISA indireto até os 90 dias de vida

Grupo	DO Tipo D (Média ± Desvio padrão)		
	Dias de vida		
	7	45	90
B1	0,282 ± 0,160 ^{aA}	0,161 ± 0,102 ^{aB}	0,056 ± 0,071 ^{aC}
B2	0,281 ± 0,182 ^{aA}	0,147 ± 0,118 ^{aB}	0,047 ± 0,089 ^{aC}
B3	0,335 ± 0,133 ^{aA}	0,190 ± 0,120 ^{aB}	0,084 ± 0,116 ^{aC}
B4	0,240 ± 0,097 ^{aA}	0,046 ± 0,038 ^{bB}	0,007 ± 0,024 ^{aB}
Controle	0,058 ± 0,068 ^{ba}	0,025 ± 0,033 ^{ba}	0,047 ± 0,105 ^{aA}

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

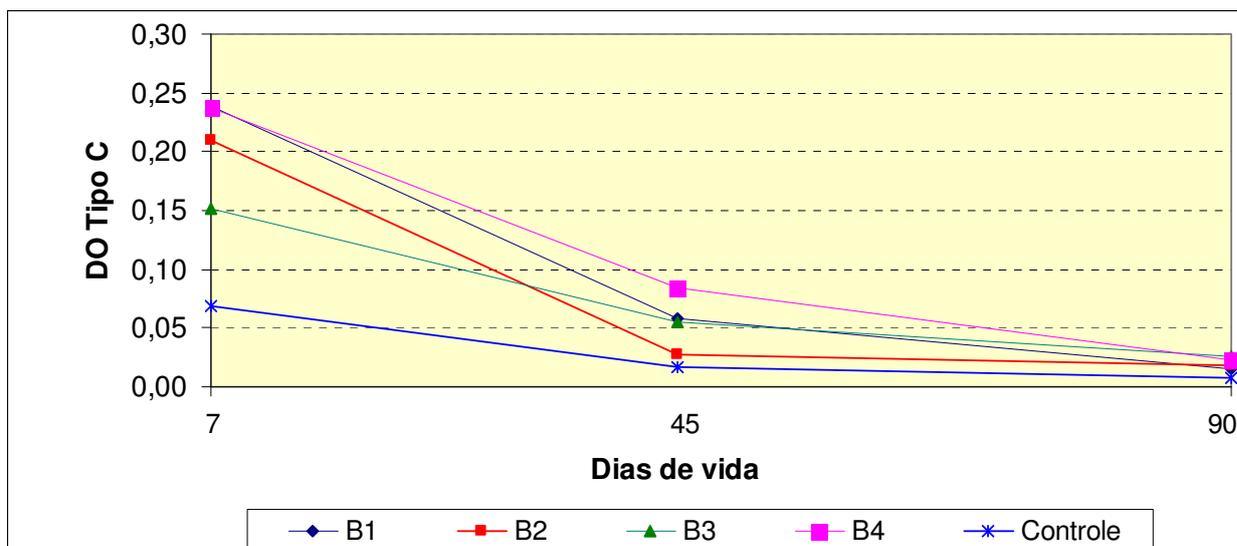


Figura 5. Imunidade passiva para a toxina botulínica tipo C em bezerros até os 90 dias de vida, avaliada pelo teste de ELISA.

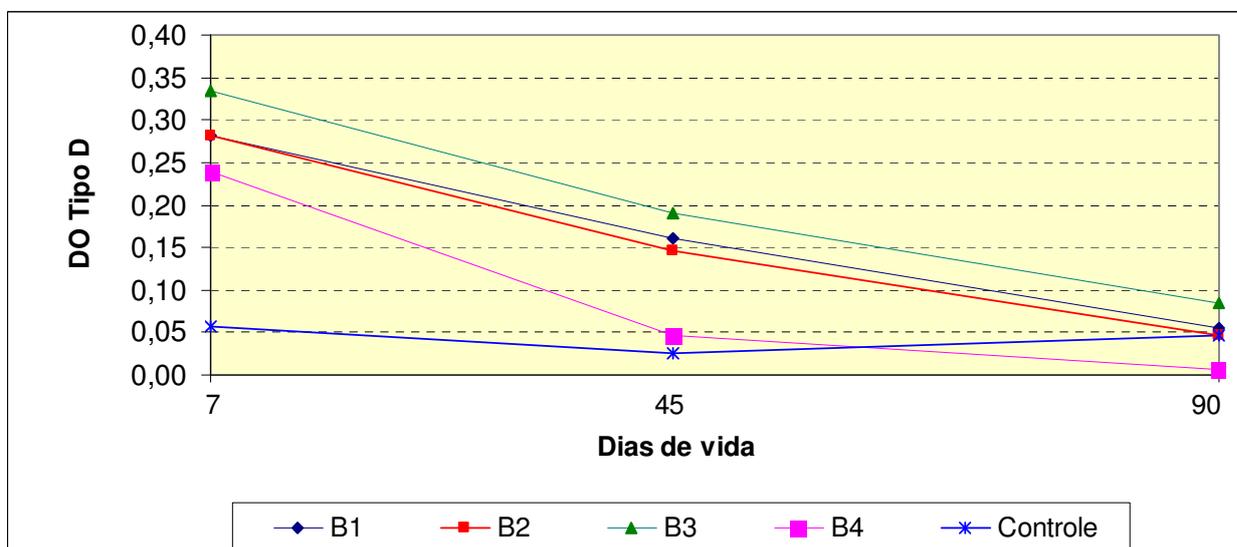


Figura 6. Imunidade passiva para a toxina botulínica tipo D em bezerros até os 90 dias de vida, avaliados pelo teste de ELISA.

Tabela 6. Coeficiente da correlação linear entre os dia da vacinação das mães e o nascimento dos bezerros, para os tipos C e D

Densidade Óptica	Coeficiente de Correlação (r)	P
Tipo C	- 0,782	< 0,0001
Tipo D	- 0,174	0,1826

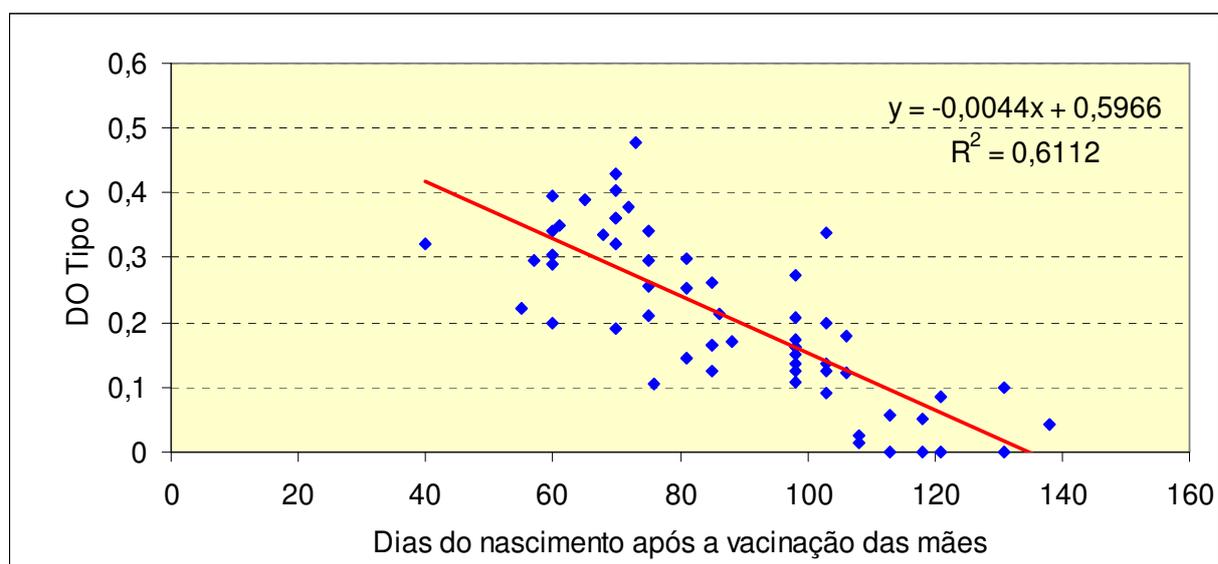


Figura 7. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) para a toxina botulínica tipo C, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães, com a representação da reta ajustada e coeficiente de determinação (R^2).

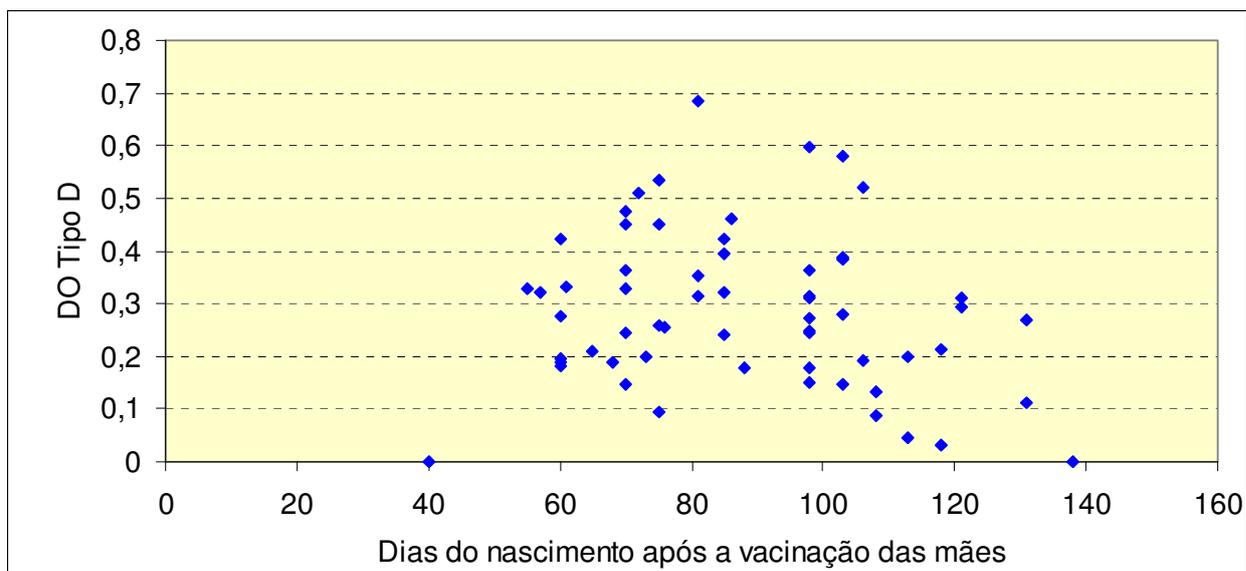


Figura 8. Diagrama de dispersão dos valores de anticorpos maternos (DO) para a toxina botulínica tipo D, em função do dia do nascimento dos bezerros após a vacinação das mães.

5.4 Resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D: análise dos grupos de acordo com a faixa etária

Com a vacina comercial bivalente, o grupo de animais com idade acima de cinco anos apresentou valores de anticorpos estatisticamente superiores aos outros grupos tanto para a toxina tipo C quanto para a toxina tipo D ($p < 0,05$), quando avaliados 30 dias após o reforço (Tabela 7). Entre os grupos de animais, inferior a 2 anos de idade e entre 2 e 5 anos de idade, não houve diferenças significativas na resposta.

A vacina bivalente apresentou nos três grupos avaliados uma magnitude na resposta sorológica contra o toxóide D em relação ao toxóide C (Figura 9).

Tabela 7. Valores médios da resposta humoral (DO) para as toxinas botulínicas tipos C e D de bovinos vacinados e avaliados 30 dias após o reforço segundo a faixa etária e o tipo de toxina

Faixa etária (anos)	Densidade Óptica ($\bar{x} \pm EPM$)	
	Anti C	Anti D
Até 2	0,273 \pm 0,014 bB	0,505 \pm 0,052 bA
De 2 a 5	0,297 \pm 0,023 bB	0,412 \pm 0,035 bA
Acima de 5	0,396 \pm 0,023 aB	0,640 \pm 0,050 aA

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

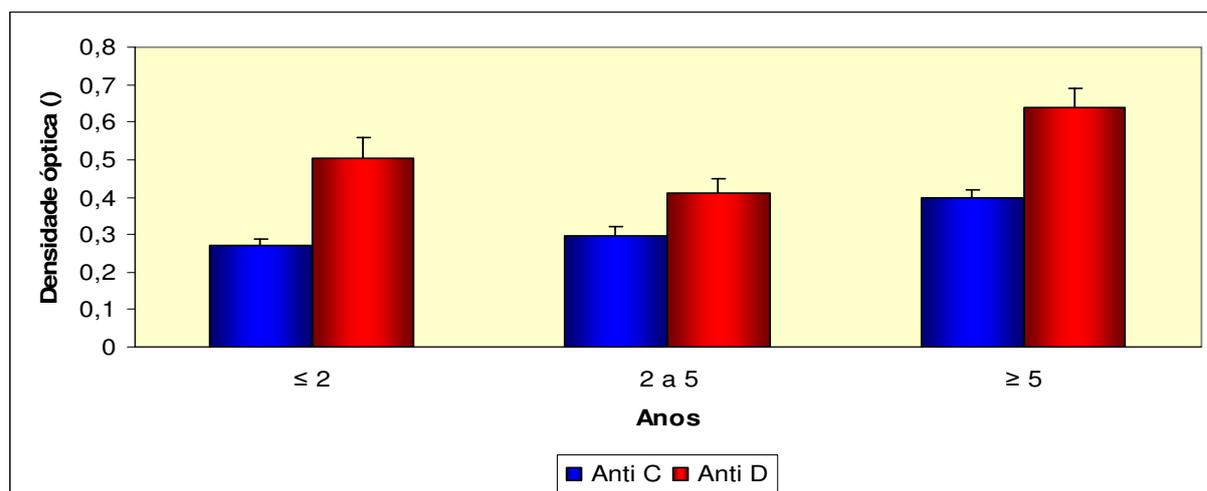


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios da resposta humoral de bovinos vacinados com toxóide botulínico bivalente C e D nas diferentes faixas etárias, avaliados pelo teste de ELISA indireto 30 dias após a dose reforço.

6. DISCUSSÃO

A ocorrência do botulismo no país tem sido reportada de grande relevância econômica e sanitária como causa de mortalidade bovina. As complexidades do manejo sanitário preventivo da doença reforçam a necessidade de adoção de medidas profiláticas específicas nos sistemas de produção, incluindo a suplementação mineral, a eliminação sistemática de carcaças e a utilização de vacinas contra o botulismo tipos C e D em bovinos. Na maioria das propriedades em que ocorreram surtos da doença, as falhas nas práticas sanitárias e ausência de vacinação foram predominantes e estiveram associados à prevalência da intoxicação (DUTRA, 2001).

As vacinas antibotulínicas bivalentes C e D comercializadas no Brasil no período de 1986 a 1989, quando avaliadas, não atendiam satisfatoriamente as exigências mínimas de antitoxinas C e D para a imunização dos bovinos (LOBATO, 1989). Na ocasião, não havia o controle oficial dos produtos comercializados e de quatro vacinas avaliadas, nenhuma atendia os padrões mínimos exigidos, segundo a metodologia descrita por STERNE & WENTZEL (1950).

O controle de produção das vacinas, estabelecendo títulos mínimos de anticorpos em unidades internacionais para a comercialização, torna-se complexo quando não existe a informação sobre o grau de imunidade necessária para proteger os animais expostos ao material tóxico. No campo, como não é conhecida a quantidade de toxina ingerida pelos animais, é desejável que as vacinas comerciais contenham uma quantidade de toxóides suficientes para desencadear o mais alto grau de imunidade possível (JANSEN et al., 1976).

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, todos os grupos vacinados com os produtos comerciais em teste apresentaram um aumento significativo de anticorpos para as toxinas botulínicas tipos C e D após a aplicação das vacinas. No entanto, ao longo do experimento, ocorreram diferenças significativas entre as vacinas em determinados momentos avaliados. Tanto na indução de anticorpos para o tipo C quanto para o tipo D, a vacina 1, apresentou, aos 75 dias da vacinação, maior indução de anticorpos em relação às outras vacinas. Variações semelhantes na resposta

humoral para as toxinas botulínicas tipos C e D após a revacinação, foram descritas por FONSECA (2001) e QUEIROZ (2001), quando também avaliaram vacinas bivalentes comerciais em bovinos.

Aos 160 dias, as quatro vacinas comerciais avaliadas já não apresentavam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si na produção de anticorpos, tanto para o tipo C quanto para o tipo D. Após este período e quando avaliada a resposta aos 250 dias, os quatro grupos vacinados apresentaram baixos valores de anticorpos e aos 342 estes valores não diferiram dos determinados no grupo controle. Possivelmente os valores encontrados são insuficientes para a garantia de uma boa imunidade ao rebanho neste período, sendo necessário reavaliar substancialmente o protocolo de vacinação anual. A magnitude da resposta sorológica dos animais para o tipo D, quando comparada com a do tipo C, foi também descrita por LOBATO et al. (1999) e FONSECA (2001).

Outro aspecto relevante quando se pretende prevenir a intoxicação está relacionado à formulação das vacinas. Contra a toxina tipo C, os dois toxóides bivalentes foram superiores aos dois toxóides polivalentes 30 dias após a 2ª dose da vacina, com diferença significativa neste momento ($p < 0,05$). Contra a toxina tipo D, esta magnitude na resposta humoral ocorreu em quase todos os momentos avaliados, exceto aos 160 dias, quando estatisticamente não diferiu das vacinas polivalentes (Tabela 3).

A avaliação da imunogenicidade dos toxóides C e D, quando comparadas por LOBATO et al. (1999), revelaram que a vacinação dos bovinos com toxóides botulínicos bivalentes C e D foi menos eficiente que na formulação com toxóides monovalentes. No Brasil inexistem produtos comerciais monovalentes contra o botulismo. No campo, melhores resultados são alcançados com a utilização de toxóides bivalentes C e D em razão da presença de *Clostridium botulinum* no ambiente e no trato digestivo dos animais, capazes de produzir os dois tipos de toxinas (TAMMEMAGI & GRANT, 1967; JANSEN et al. 1976).

A eficácia de vacinas bivalentes C e D no controle do botulismo já foi relatada por alguns autores. DUTRA & DÖBEREINER (1996) verificaram em uma propriedade rural com histórico epidemiológico, clínico, patológico e laboratorial de botulismo, 31 mortes

entre os animais não vacinados e apenas uma entre os animais vacinados. Recentemente, STEINMAN et al. (2006) também verificaram a eficácia de uma vacina comercial bivalente avaliando surtos naturais da doença entre os anos de 2002 e 2006. Segundo os autores, a probabilidade de animais de 6 a 24 meses de idade, não vacinados, serem acometidos pela enfermidade foi de 96%. Entre os grupos de animais vacinados e acometidos pela doença, as fêmeas com menos de três parições ou nulíparas foram as mais afetadas, enquanto as múltiparas demonstraram maior resistência à intoxicação devido ao número de inoculações em anos anteriores.

A utilização de vacinas comerciais com formulações polivalentes com vários antígenos está cada vez mais evidente nos vários sistemas de produção em face da praticidade no manejo, redução de custos e mão de obra, porém, seu emprego deve estar relacionado às informações epidemiológicas sobre as reais necessidades que justifique a inclusão de mais de uma dezena de diferentes antígenos opcionais. Isto posto, a justificativa comercial não deve sobrepor a racionalidade técnica com riscos e desdobramentos sanitários imprevisíveis.

Na avaliação da imunidade passiva, os bezerros nascidos de mães imunizadas com diferentes toxóides (Tabela 4 e 5), apresentaram anticorpos maternos contra a toxina tipo C e D e não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Isto demonstra que as diferentes vacinas utilizadas nas mães foram similares na transferência da imunidade para os bezerros. Quando avaliados aos 45 dias, os grupos apresentaram baixa concentração de anticorpos e aos 90 dias não diferiram do controle. Estes resultados são contrários aos encontrados por BROWN et al. (1999), quando detectaram uma alta concentração de anticorpos maternos contra o tipo C e D em desmamas de bezerros com 6 meses de idade; contudo, os autores relatam que as mães haviam sido vacinadas em várias ocasiões.

Embora a absorção de anticorpos colostrais pelos recém-nascidos possa ser afetada por vários fatores, a imunidade transferida de forma passiva pelas mães vacinadas proporciona maior resistência aos bezerros de serem acometidos pela intoxicação. Esta informação foi comprovada por STEINMAN et al. (2006), quando avaliaram surtos naturais de botulismo e verificaram que a probabilidade de animais de

2 a 6 meses de idade, não vacinados serem acometidos pela doença era de 24%, provavelmente protegidos por anticorpos de origem materna.

Outro aspecto relevante deste experimento foi a correlação da melhor resposta humoral passiva dos bezerros com a data de vacinação das mães e o dia do parto. Quanto mais próximo a vacinação das mães foi do parto, maiores foram os valores de anticorpos detectados nos bezerros. Sob esse aspecto, torna-se relevante a vacinação das fêmeas reprodutoras pelo menos 30 dias antes da parição (2ª dose). Contudo, essa correlação linear ocorreu apenas para o tipo C.

Quando comparada a resposta humoral para as toxinas botulínicas tipos C e D de bovinos vacinados em diferentes idades (Tabela 7), o grupo de animais com idade acima de cinco anos apresentou valores de anticorpos estatisticamente superiores aos outros (inferior a 2 anos de idade e entre 2 e 5 anos de idade), tanto para a toxina tipo C quanto para o tipo D ($p < 0,05$), quando avaliados 30 dias após o reforço. Os resultados também demonstraram que a vacina bivalente, utilizada neste experimento, apresentou nos três grupos avaliados, resposta sorológica significativamente maior contra o toxóide D em relação ao toxóide C (Figura 7), o que corrobora com estudos realizados por LOBATO et al. (1999) e FONSECA (2001).

Os resultados do presente trabalho revelaram alguns aspectos inéditos na literatura e certamente de valor para a sanidade animal. Resultados de aplicação prática e de importância na prevenção da doença, apresentam subsídios para a execução de programas de vacinação contra o botulismo e para a fabricação de produtos de qualidade assegurada.

7. CONCLUSÕES

Os resultados da resposta humoral obtidos em bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D, avaliados pelo teste de ELISA indireto, permitiram concluir que:

- a) Ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas vacinas avaliadas, principalmente aos 30 dias após a dose reforço;
- b) Após o período de 160 dias, nenhuma das vacinas avaliadas apresentou uma resposta humoral significativa contra a toxina tipo C;
- c) Os toxóides C e D de vacinas bivalentes comerciais foram superiores aos toxóides C e D de vacinas polivalentes na indução de anticorpos, principalmente contra o tipo D;
- d) Independente das vacinas empregadas na imunização ativa das mães, não houve diferenças significativas na imunidade passiva dos bezerros aos sete dias de vida;
- e) A redução dos anticorpos passivos nos bezerros foi significativa aos 90 dias de idade, alcançando valores médios que não diferiram dos valores determinados no lote do controle;
- f) Somente os anticorpos colostrais de origem materna contra a toxina botulínica C, e não o tipo D, tiveram uma correlação linear mais relevante nos bezerros quando as mães foram vacinadas nos períodos mais próximos do parto;
- g) Bovinos com idade acima de cinco anos apresentaram para ambos os toxóides, resposta sorológica significativamente superior as faixas etárias mais baixas;
- h) A vacina bivalente apresentou nos três grupos de diferentes idades, uma magnitude melhor na resposta humoral contra o toxóide D, quando comparada ao tipo C.

8. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: OPS/OMS, 1986. 989 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Sanitária. Instrução Normativa nº 23, de 18 de março de 2002, dispõe sobre o regulamento técnico para a produção, controle e emprego de vacinas contra o botulismo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2002. Seção 1, p. 10.

BROWN, A.T.; GREGORY, A.R.; ELLIS, T.M.; HEARNDEN, M.N. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 6, p. 388-391, 1999.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Deutsche Tierarzliche Wochenschrift**. v. 99, n. 5, p. 188-190, 1992.

DOWELL, V.R.; HAWKINS, T.M. **Laboratory methods in anaerobic bacteriology: CDC laboratory manual**. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1974. 96 p.

DUTRA, I.S. **Epidemiologia, sinais clínicos e diagnóstico pela soroneutralização em camundongo do botulismo em bovinos no Brasil**. 2001. 152 p. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Eficácia da Vaxall – vacina botulínica bivalente – na prevenção do botulismo em bovinos. **Hora Veterinária**, v.16, n. 93. p. 22-26, 1996.

DUTRA I.S, DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

DUTRA, I.S.; WEISS, H.E.; WEISS, H.; DÖBEREINER, J. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.13, n. 3/4, p. 83-86, 1993.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V.; SOUZA, L.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-48, 2001.

ELLIS, C.E.; HAMMAN, M.; HARRIS, H.; BRUIN, R. In vitro evaluation methods for *Clostridium botulinum* type C and D vaccines. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p.369-372, 1999.

FONSECA, F.S. **Comparação da resposta humoral de bovinos e cobaias vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D**. 2001. 55 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GIMÉNEZ, D.F.; CICCARELLI, A.S. *Clostridium botulinum* en Argentina: present y futuro. **Revista Asociación Argentina Microbiología**, v. 8, n. 2, p. 82-91, 1976.

GREGORY, A.R.; ELLIS, T.M.; JUBB, T.F.; NICKELS, R.J.; COUSINS, D.V. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 2, p. 55-61, 1996.

JANSEN, B.C.; KNOETZE, P.C.; VISSER, F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 4, p. 165-174, 1976.

KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. Botulism. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (ed.). **Infectious diseases of livestock**. Cape Town: Oxford Press, 1994. p. 1354-1371.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 37-42, 1988.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Fatores predisponentes dos surtos de botulismo no cerrado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: 1980, p.16.

LISBOA, J.A.N.; KUCHEMUCK, M.R.G.; DUTRA, I.S.; GONÇALVES, R.C.; ALMEIDA, C.I.; BARROS FILHO, I.R. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos bovinos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 2/3, p. 67-74, 1996.

LOBATO, F.C.F. **Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil**. 1989. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

LOBATO, F.C.F.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V.; SILVA, N.; NASCIMENTO, R.A.; MARTINS, N.E. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 25-27, 1999.

NOBREGA, F.L.C. **Resposta humoral de ovinos vacinados com toxóides botulínicos tipo C e D.** 2007. 41 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

QUEIROZ, R.A. **Desenvolvimento de teste de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra as toxinas C e D de *Clostridium botulinum* em bovinos.** 2001. 51p. Dissertação (Mestrado Interinstitucional em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc^R: version 8 Cary, NC:SAS Institute Inc., 1999.

SMITH, L.D. **Botulism:** the organism, its toxins, the disease. Springfield: Charles C. Thomas, 1977. 236 p.

SMITH, L.D.; SUGIYAMA, H. **Botulism:** the organism, its toxins, the disease. 2. ed. Springfield: Charles C. Thomas, 1988. 171 p.

STEINMAN, A.; CHAFFER, M.; ELAD, D.; SHPIGEL, N. Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against Botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 8, p.862-868, 2006.

STERNE, M.; WENTZEL, L.M. A new method of the large scale production of high titre botulism formol toxóide types C and D. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 65, n. 2, p. 175-183, 1950.

TAMMEMAGI, L.; GRANT, K.M. Vaccination in control bovine botulism in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 43, n. 9, p. 368-373, 1967.

TREILER, A.; ROBINSON, E.M. Der Botulismus der Haustiere. **Zsch. Infektionskr.**, v. 31, p. 165-220, 1927.

THOMAZ, R.J. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 3, p. 111-113, 1991.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S.S. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 1-16, 1988.

TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; CARVALHO, E.V. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 465-472, 1970.

WEISS, H.E.; WEISS, H. Nachweiss von *Clostridium botulinum* -Toxin mittels Mikro-Warmekomplementbindungsreaktion. **Tierarliche Umschau**, v. 43, p. 117-126, 1988.