

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FABIANA LARA CASTOR DA NOBREGA

RESPOSTA HUMORAL DE OVINOS VACINADOS COM TOXÓIDES
BOTULÍNICOS C E D

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FABIANA LARA CASTOR DA NOBREGA

RESPOSTA HUMORAL DE OVINOS VACINADOS COM TOXÓIDES
BOTULÍNICOS C E D

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
da Universidade Paulista "Julio de
Mesquita Filho"- UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

DEDICO

A Deus.

À minha avó Zelfa e ao meu avô Eider (*in memoriam*), pelo amor incondicional, apoio,
credibilidade e incentivo aos meus estudos.
Ao Rafael, por estar ao meu lado sempre e me mostrar que a vida não é tão difícil quanto
parece.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, pela confiança, amizade e por sua valiosa colaboração, imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Selma e Einar, e a minha irmã Tatiana, pelo carinho, dedicação e amor incondicional.

À Profa. Tereza Cristina Cardoso, por ceder seu laboratório, pela transferência espontânea de seus conhecimentos e pela adorável convivência.

À Vera C. L. M. Curci, pela amizade sincera, pelo companheirismo e pela força nos momentos difíceis.

À Rosa Maria Ferreira, pela amizade e pelos ensinamentos passados com tanta paciência e dedicação.

Ao Adão, pela prontidão em ajudar nas coletas, momentos cansativos, mas divertidos.

À Profa. Caris, Nunes pelas dicas 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, Fátima e Alexandra – UNESP- Campus Araçatuba, pela colaboração, paciência, presteza e dedicação.

Aos colegas do mestrado: Nandressa, Cláudia, Flávia Delbem, Cristiano, Bruno, Caio, Heitor, Flávia Feres, Adriana, Gisele, Verônica, Rodrigo, Daniel, Thiago pelo adorável convívio e pelas brincadeiras nas tardes quentes de Araçatuba.

À Gilmara pela convivência amiga e pela colaboração na lavagem de todo material utilizado para a realização dos ELISA.

Ao Arnaldo dos Santos Vieira Filho, pela confiança e receptibilidade, permitindo que o experimento fosse realizado com seus animais.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro) de Pedro Leopoldo-MG, pelo fornecimento das antitoxinas e pela titulação da antitoxina produzida na UNESP, em especial ao Dr. Mauricio Carvalho.

À Universidade Estadual Paulista, pela viabilidade da realização do mestrado.

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

RESUMO

Foi avaliada a resposta imune de ovinos vacinados com toxóides botulínicos comerciais. Os animais dos Grupos (n=10) 1 e 2 foram vacinados com os toxóides bivalentes C e D, o Grupo (G) 3 recebeu a vacina polivalente contendo bacterinas e toxóides de outros *Clostridium*. e os pertencentes ao Grupo Controle não foram vacinados. O reforço vacinal foi realizado aos 42 dias após a dose inicial, e os níveis séricos de anticorpos contra as toxinas C e D foram avaliados pelo teste de ELISA indireto antes da vacinação, 15, 42, 90 e 180 dias após a primovacinação. Aos 15 dias da avaliação todos os grupos vacinados apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) nos títulos de anticorpos contra as toxinas C e D, com amplitude significativamente superior nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos animais do G2 e contra a toxina D nos animais do G1. Aos 42 dias da vacinação primária houve uma queda significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos vacinados. Em relação à toxina D, somente o G1 apresentou queda nos níveis de anticorpos. Após o reforço vacinal dos grupos, quando avaliados aos 90 dias, observou-se novamente um aumento significativo nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos, entretanto não houve variação nos níveis de anticorpos contra a toxina D. Ao longo dos 180 dias, o G2 apresentou, contra a toxina C, níveis de anticorpos superiores ao apresentado pelos outros grupos, porém contra a toxina D não houve variação significativa entre os grupos analisados após o reforço vacinal.

Palavras-chave: Botulismo, vacina antibotulínica, resposta imune, ovinos.

NOBREGA, F.L.C. **Immune response in sheep vaccinated with botulinum toxoids C and D.** 2007. 41 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

ABSTRACT

The immune response from sheep vaccinated against commercial botulinum toxoids was evaluated. The animals from Group (n=10) 1 and 2 were vaccinated with bivalent toxoids C and D, the Group (G) 3 received the polyvalent vaccine contained toxoids from other *Clostridium* and non-vaccinated animals were used as a control group. The booster dose was realized at 42 days after the initial dose and the antibodies levels against C and D toxins were evaluated by indirect ELISA, before of vaccination and 15, 42, 90 and 180 days after vaccination. At 15 days, the antibody level was significantly higher ($P<0,05$) against toxin C and D in all vaccinated groups, with antibodies levels against toxin C significantly higher ($P<0,05$) in the animals from G2 and against toxin D in the animals from G1. At 42 days of primary vaccination the antibodies levels against toxin C in the three vaccinated groups, while only the levels antibodies against toxin D from G1 showed a decrease. After the booster dose, at 90 days, a significantly higher in antibody levels against toxin C was observed, while no difference was observed against toxin D antibody levels. During 180 days, the G2 presented against toxin C antibody levels higher than presented by other groups, however against toxin D wasn't significant variation between the groups after the booster dose.

Keywords: Botulism, botulin vaccine, immune response.

SUMÁRIO

1 Introdução	7
2 Revisão de Literatura	8
3 Objetivos	15
4 Material e Métodos	16
4.1 Animais	16
4.2 Vacinas Comerciais	16
4.3 Grupos experimentais	16
4.4 Coleta e armazenamento do soro sanguíneo	16
4.5 Produção e semi-purificação do antígeno	17
4.6 Soros controles	17
4.7 Técnica de ELISA indireto	18
4.8 Análise estatística	19
5 Resultado	20
6 Discussão	23
Referências	25
Artigo enviado para publicação	29

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura está se destacando como a atividade de produção animal que mais cresce no país, pois existe uma crescente demanda por carne de cordeiro. O país tem potencial para ser o maior produtor de carne ovina do mundo; certamente com grande impacto socioeconômico no meio rural. Na Austrália e Nova Zelândia, onde estão concentrados os maiores rebanhos ovinos, existem grandes perdas econômicas anuais, causadas por diversas enfermidades e dentre elas destaca-se o botulismo. No Brasil, a enfermidade tem importância crescente e está relacionada à deficiência de fósforo e proteína que os animais adquirem quando não devidamente suplementados.

A enfermidade é causada pela ação de toxinas de natureza protéica produzida pelo *Clostridium botulinum*. São conhecidos sete tipos antígenoicamente distintos de toxina: A-G, e a doença em animais pecuários é causada principalmente pelos tipos C e D.

Os ovinos contraem a intoxicação pela ingestão de carcaças, da mesma forma que os bovinos. Essa sarcofagia nos ovinos é mais acentuada nos meses de inverno, por falta de alimentação protéica na pastagem. Surtos de botulismo são observados ainda em bovinos e ovinos que consomem pastagens adubadas com esterco ou cama de frango ou que consomem água contaminada com carcaças de animais mortos.

Dentre as medidas de controle preconiza-se principalmente a suplementação de fósforo e proteína, a utilização de água e alimentos de boa qualidade e a imunização ativa com toxóide bivalente C e D.

Diante da ausência de trabalhos relacionados com a mensuração da resposta imune de ovinos à vacinação com toxóides botulínicos C e D, o presente estudo avaliou a resposta imune de ovinos, pelo teste de ELISA, de vacinas antibotulínicas bivalentes C e D comerciais e uma vacina polivalente contra clostridiose contendo ainda os toxóides.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O botulismo em ruminantes é uma intoxicação com alta letalidade, provocada pela ingestão de neurotoxinas previamente formadas pelo *Clostridium botulinum*. Este microorganismo pertence ao gênero *Clostridium*, que compreende um grupo de bactérias anaeróbias, Gram-positivas, formadoras de esporos e produtoras de toxinas. O *Clostridium botulinum* se encontra sob a forma de esporos no solo, na água, em conservas alimentares e no trato digestivo dos animais.

São conhecidos 7 sorotipos de toxinas botulínicas designadas pelas letras A, B, C, D, E, F e G. As toxinas A, B, E e F são responsáveis pelo botulismo em humanos (ACHA; SZYFRES, 1986), enquanto as toxinas C e D causam o botulismo em aves, eqüinos, ovinos, bovinos e em outros animais (SMITH, 1977).

As toxinas botulínicas são reconhecidas como as mais potentes de origem biológica (SAKAGUCHI, 1982). Estas toxinas são trezentas vezes mais letais do que a toxina diftérica e a ricina (MIDDLEBROOK; SIMPSON, 1989). Ela atua bloqueando a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos nas junções neuromusculares, causando a paralisia (BURGEN et al. 1949; GURDERSEN, 1980). A toxina age ligando-se a uma molécula receptora nos terminais nervosos periféricos, então o complexo toxina-receptor sofre uma endocitose, e em uma terceira etapa a toxina no interior da célula bloqueia a liberação do neurotransmissor (ATASSI; OSHIMA, 1999; ROSSETO et al., 2001).

O botulismo em ovinos domésticos foi primeiro documentado na Austrália em 1928 e durante anos foi considerada entre todas as enfermidades a que causou maiores perdas econômicas anuais, até a vacinação ser instituída (BENNETS; HALL, 1938).

Os ovinos não apresentam a paralisia flácida típica de outras espécies até os estágios finais da doença. Há rigidez durante a marcha e incoordenação, bem como alguma excitabilidade nos estágios iniciais. A cabeça pode estar apoiada lateralmente ou curvar-se

para cima e para baixo, enquanto o animal caminha (KRIEK; ODENDAAL, 1994; RADOSTITS et al., 2000), são evidentes também os espasmos do diafragma e da cauda, a salivação excessiva e o fluxo nasal intenso (SMITH, 1977).

As lesões macroscópicas encontradas em ovinos cuja causa da morte foi o botulismo são: acúmulo de fluídos em cavidades, edema pulmonar hemorragia do epicárdio, congestão da mucosa do intestino delgado e sugestiva falência do coração (VAN DER LUGGT et al., 1995).

Surtos de botulismo em bovinos são causados pelas toxinas C e D e estão associados à osteofagia, à ingestão de alimentos e água contaminados (DUTRA, 2001).

Após a morte do animal, mesmo não tendo sido acometido pelo botulismo, mas tendo esporos de *Clostridium botulinum*, são criadas condições para a formação de sua toxina no cadáver. Nessa situação, produzem toxina inclusive dentro dos ossos, principalmente nas costelas (RIBAS et al., 1994), sendo essas carcaças fontes potenciais de intoxicação durante vários anos (TOKARNIA et al., 1970).

Como no botulismo bovino, em ovinos a deficiência de fósforo nas pastagens induz os animais à osteofagia. No entanto uma dieta pobre em proteínas e carboidratos é também responsável pelo botulismo em ovinos, levando os animais à sarcófagia (SMITH, 1977).

A intoxicação com as toxinas C e D ocorre também pelo emprego da cama de frango para alimentação de animais confinados e semiconfinados e para a adubação de pastagens, e muitas vezes há a presença de cadáveres em decomposição (HOGG et al., 1990; JEAN et al., 1995; DUTRA et al., 2005). A Veterinary Laboratories Agency's (2006) relatou o surto de botulismo em ovelhas prenhes que se alimentaram de pasto fertilizado com cama de frango; no episódio morreram 80 ovelhas, de um total de 230.

Em alguns países do hemisfério sul e no Brasil foram relatados surtos de intoxicação botulínica de origem hídrica em búfalos e bovinos devido à presença de

carcaças nas cacimbas construídas com a finalidade de fornecer água aos animais (LANGENEGGER; DÖBEREINER, 1988; DUTRA et al., 2001; SOUZA et al., 2006). Em um parque na Califórnia, a morte de 45 ovinos silvestres foi atribuída à ingestão de água contaminada proveniente de tanques onde carcaças de animais foram encontradas (SWIFT et al., 2000).

Sete surtos da intoxicação em bovinos foram descritos por Dutra et al. (2001). Os dados clínico-patológicos, epidemiológicos e os achados laboratoriais indicaram a possível ingestão da toxina botulínica por meio da água contaminada. As circunstâncias em que ocorreram os surtos estiveram relacionadas com a existência de carcaças de animais decompostas ou matéria orgânica vegetal na água.

Na África do Sul, Van der Lugt et al. (1995) verificaram, por meio de soroneutralização em camundongos, que a toxina botulínica tipo C e D desencadearam dois surtos de botulismo, atribuídos à ingestão de alimentos mal conservados, em que 429 ovinos morreram.

Dutra et al. (2005) descreveram sete surtos da intoxicação em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango, ocorridos nos estados de São Paulo e Minas Gerais entre 1989 e 2000. De um total de 1.535 animais alimentados regularmente com a cama de frango, 455 (29,64%) morreram em um período que variou de 2 a 4 semanas. A presença de esporos de *Clostridium botulinum* foi detectada em amostras de cama de frango colhidas nas sete propriedades. Nas amostras de fígado, líquido ruminal e intestinal, provenientes dos 30 animais necropsiados, foi possível detectar toxinas botulínicas pertencente ao complexo CD.

As medidas de controle do botulismo estão relacionadas principalmente ao manejo sanitário dos animais. Entre estas medidas destaca-se o manejo adequado do ambiente, com a retirada dos cadáveres da pastagem, suplementação alimentar adequada, a vacinação

antibotulínica (DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA; DÖBEREINER, 1995) e o isolamento de fontes de água estagnada suspeita de contaminação.

A eliminação correta de cadáveres das pastagens é uma medida fundamental e tem a finalidade não somente de impedir que os animais tenham acesso às fontes de intoxicação mas também evitar a contaminação ambiental pelos esporos de *Clostridium botulinum* (KRIEK; ODENDAAL, 1994; DUTRA ; DOBERAINER, 1995).

Filmer (1937) encontrou botulismo em ovelhas, cujo conteúdo sanguíneo de fósforo era normal, observou que o fornecimento de fósforo no campo não previne o botulismo como quando feita a suplementação de ração com aveia, trigo ou farelo de linho.

A suplementação de ração com proteínas e carboidratos separados não previnem o botulismo, sendo necessário o fornecimento conjunto dos dois nutrientes (SMITH, 1977).

Assume importância fundamental para a redução da mortalidade pelo botulismo, em ovinos e bovinos, a imunização ativa pela vacinação com toxóide bivalente C e D (DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA; DÖBEREINER, 1996; STEINMAN et al., 2006).

Na África do sul e na Austrália, onde se encontram os maiores rebanhos ovinos do mundo, a imunização ativa contra o botulismo tem sido utilizada desde 1938, sendo assim uma prática rotineira no manejo sanitário dos rebanhos bovinos e ovinos mantidos em áreas com potencial de ocorrência de botulismo (KRIEK; ODENDAAL, 1994).

Não existem informações definitivas sobre a quantidade de toxinas ingerida pelos animais na intoxicação. Nestas circunstâncias, o nível de imunidade necessário para os animais expostos ao material tóxico não pode ser reconhecido na prática, sendo, portanto, necessário fornecer o mais alto grau de imunidade possível (JANSEN et al., 1976).

As primeiras vacinas utilizadas na prevenção do botulismo foram desenvolvidas por Benets e Hall (1938) e por Manson et al. (1938), na Austrália e na África do Sul. No Brasil, a utilização de vacinas antibotulínicas se deu na década de 70, a partir do primeiro

diagnóstico da doença (TOKARNIA et al., 1970). Em países como a Austrália e África do Sul, a imunização de bovinos contra o botulismo epizootico provocado pela toxina botulínica tipos C e D é feita desde a década de 1930 (BENNETS; HALL, 1938; MANSON et al., 1938).

Nos últimos anos ocorreu um crescimento significativo na produção de imunógenos no país, entretanto a eficiência desses tem sido questionada, e por isso constantemente têm sido lançadas novas vacinas no mercado (QUEIROZ, 2001).

Ao avaliar a potência de vacinas contra a toxina botulínica, comparando o toxóide tipo C em camundongos, cobaias e martas, Pranter (1976) observou que as vacinas testadas mostraram-se eficientes, cumprindo as taxas de sobrevivência em todas as diluições. No teste realizado nos cobaias, uma dose única de 1 mL via subcutânea recomendada pelo fabricante conferiu o título de 0,4 UI/ml não atingindo o nível mínimo de 5 UI/ml para o sorotipo C. Entretanto, quando avaliados aos 10 dias após a revacinação, os níveis de anticorpos atingiram 6,5 UI/mL, ultrapassando os títulos mínimos de proteção.

A eficiência de imunógenos antibotulínicos bivalentes C e D provenientes de laboratórios produtores de vacinas no Brasil foi avaliada por Lobato (1989), que verificou, utilizando a técnica de soroneutralização em camundongos, a presença de baixos níveis de antitoxinas nos soros de bovinos vacinados.

Dutra e Dobereiner (1996) avaliaram a eficiência de uma vacina botulínica bivalente C e D de origem australiana em bovinos. O teste foi realizado no campo, com desafio natural e em animais primo-vacinados. Foi comprovada a eficácia da vacina, pois ocorreu a morte de 31 animais não vacinados e de apenas um vacinado.

Ainda utilizando o teste de soroneutralização em camundongos, Lobato et al. (1999) constaram que os níveis de anticorpos de bovinos que receberam duas doses de

reforço, eram maiores duas semanas após o reforço, demonstrando assim a necessidade de dose reforço para alcançar altos níveis de anticorpos.

A resposta humoral de cobaias e bovinos vacinados com três toxóides antibotulínicos bivalentes tipos C e D comercializados no Brasil foi comparada por Fonseca (2001). Na ocasião, as cobaias apresentaram uma reposta imune significadamente maior que os bovinos. E ao avaliar qual seria o melhor intervalo para ser realizada a revacinação, verificou que, quando efetuada aos 42 dias após o estímulo primário, os bovinos apresentaram uma titulação de anticorpos superior quando comparada aos 30 dias.

No Brasil, as normas para produção e controle das vacinas contra botulismo foram regulamentadas pela Portaria N°574 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicada no Diário Oficial de 20/03/2002. Para ser aprovada, a partida em teste deve conter no mínimo 5 UI/mL de antitoxinas para o tipo C e 2 UI/mL para o tipo D (BRASIL, 2002), sendo essa titulação realizada em cobaias.

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) é considerado um teste efetivo, aplicável e com alta reatividade na análise da resposta imune humoral contra a toxina botulínica (GREGORY et al., 1996; LIDSEY et al., 2003).

O ELISA foi utilizado por Gregory et al. (1996) para detectar anticorpos contra toxina botulínica tipos C e D para investigar a freqüência da enfermidade nos rebanhos. Foram testados soros de rebanhos com e sem histórico de botulismo, vacinados e não vacinados, de regiões endêmicas, e de animais recuperados da enfermidade. Os autores afirmam que o teste de Elisa foi eficaz, com alta reatividade, estimando-se a proporção de animais expostos ou não a enfermidade, principalmente em áreas endêmicas.

A soroneutralização em camundongos e o ELISA foram comparados por Ellis et al. (1999) avaliando uma vacina monovalente e outra bivalente. O soro de cobaias vacinados foi utilizado para determinar os níveis séricos de anticorpos. Houve uma correlação entre

os dois testes em relação à toxina D quando avaliada a vacina monovalente. No entanto não houve uma correlação entre os testes quando avaliada a vacina bivalente.

Brown et al. (1999), utilizando o ELISA para avaliar em bovinos a resposta humoral de duas vacinas bivalentes com adjuvantes diferentes, constatou que a vacina contra a toxina C e D com adjuvante sem óleo mineral induziu a produção de anticorpos duas vezes maior que a vacina com adjuvante convencional (óleo mineral).

Recentemente, Steinman et al. (2006) utilizaram o ELISA para determinar a eficiência da vacinação em animais de um surto de botulismo. Foi avaliado o soro de animais vacinados e não vacinados, de diferentes idades. Os animais com níveis sorológicos acima de 0,33 unidades de ELISA resistiram ao surto. Os toxóides botulínicos conferiram proteção adequada contra a exposição de doses letais da neurotoxina botulinica tipo D.

3 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar pelo teste de ELISA a resposta humoral de ovinos vacinados com toxóides botulínicos C e D.

Específico

- Avaliar a resposta humoral de ovinos vacinados com produtos comerciais, sendo duas vacinas bivalentes C e D contra botulismo e uma polivalente contra clostridioses (contendo ainda os toxóides botulínicos) em animais que receberam uma dose de reforço 42 dias após a primovacinação.
- Avaliar a cinética da resposta sorológica nos momentos 0, 15, 42, 90 e 180 dias após a vacinação.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram empregadas ovelhas das raças Dorper, Santa Inês, Sulffolk e cruzadas, clinicamente saudáveis, sem histórico de vacinação contra botulismo. Durante a realização dos trabalhos, os animais permaneceram sob as condições de manejo usuais da propriedade rural localizada no município de Araçatuba.

4.2 Vacinas Comerciais

Foram adquiridas em casas de insumos pecuários, 3 vacinas de diferentes laboratórios comerciais, sendo duas bivalentes C e D e outra polivalente contra clostridioses contendo os toxóides botulínicos C e D, observando-se a conservação e o prazo de validade. Para manter o sigilo comercial, os laboratórios produtores e as partidas foram identificados com códigos de letras.

4.3 Grupos experimentais

Foram empregadas 40 ovelhas, divididas em 4 grupos de 10 animais. Um grupo não recebeu a vacina, constituindo assim o grupo controle (GC). Os outros grupos receberam as vacinas seguindo a dose e a via recomendada pelo fabricante. A revacinação das ovelhas foi efetuada 42 dias após o estímulo primário.

4.4 Coleta e armazenamento do soro sanguíneo

Foram coletadas amostras de sangue dos animais através de punção da veia jugular externa, com a utilização de tubos tipo Vacuntainer[®], antes da aplicação da primeira dose da vacina, e nos dias 15, 42, 90 e 180 após a vacinação. As amostras de sangue permaneceram à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo e logo após

foram centrifugadas para obtenção do soro, que foi mantido congelado (-20°C) para a utilização nos testes sorológicos.

4.5 Produção e semipurificação do antígeno

As cepas de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D utilizadas no experimento foram provenientes do Laboratório de Pesquisas em Enfermidades Infecciosas, Unesp-Araçatuba. As cepas foram inoculadas em meio de Wright, permanecendo a 37°C por 5 dias. Para avaliar a sua toxidade, 0,5 mL do sobrenadante foi inoculado por via intraperitoneal em camundongos. As frações líquidas colhidas foram centrifugadas a 2000 rpm, 4°C por 30 minutos.

O antígeno, obtido a partir do sobrenadante da cultura de *C. botulinum*, foi precipitado em sulfato de amônia (380g/L), sob a temperatura de 4°C, por 12 horas.

Posteriormente, foi centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sedimento ressuspensão 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 com a finalidade de concentrar a toxina e eliminar o excesso de sulfato de amônia. As toxinas foram aliqüotadas em tubos tipo eppendorf e congeladas a - 80 °C.

A dosagem de proteína foi realizada com o kit comercial de dosagem de proteína, pelo método colorimétrico do ácido bicinonínico (BCA) (PIERCE-U.S.A).

4.6 Soros controles

A antitoxina utilizada na padronização do ELISA e posteriormente como controle positivo foi obtidas, para a toxina D, do soro de ovinos que receberam 5 doses de vacina, sendo o intervalo entre as vacinações de 30 dias. Sua titulação foi realizada pelo

Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro) de Pedro Leopoldo. Para a toxina C foi empregada antitoxina padronizada oriunda do Lanagro.

Os soros negativos utilizados na padronização do ELISA e posteriormente como controle negativo dos testes foram obtidos de cordeiros logo após o nascimento e antes da ingestão do colostro.

4.7 Técnica de ELISA indireto

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas, individualmente e em duplicata, à titulação de anticorpos antitoxina botulínica tipo C e D pela técnica de ELISA indireto, descrita por GREGORY et al. (1996).

Placas de microtitulação de 96 poços (NUNC, Denmark) foram sensibilizadas com o antígeno diluído a 1:50 para o tipo C e 1:10 para o antígeno tipo D em tampão carbonato/bicarbonato (TCB) 0,05 M pH 9,6 (100µL/poço), por 12 horas, em câmara úmida, a 4°C.

Após cinco lavagens com PBS pH 7,4 Tween 80 a 0,1% (PBS-T), cada orifício foi bloqueado com 200µL de leite em pó desnatado (LPD) 15% diluído em TCB. A placa foi incubada em câmara úmida a 37°C durante 60 minutos, e em seguida foram realizadas cinco lavagens como descrito anteriormente.

Na seqüência, adicionaram 50 µL dos soros teste e controle diluídos em PBS-T +15% LPD, sendo a diluição para o tipo C 1:100 e tipo D 1:5. Dois orifícios da placa não receberam soro, somente o tampão, e foram utilizados como controle da placa (branco). As placas foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Nova seqüência de cinco lavagens com PBS-T foi realizada.

Cada orifício da placa recebeu 100 µL de conjugado imunoenzimático comercial (SIGMA[®]) correspondente a soro de muar produzido contra IgG ovina conjugado com

peroxidase na diluição de 1:10.000 em PBS-T + 15% LPD, sendo as placas novamente incubadas a 37°C por 2 hora. Mais cinco seqüências de lavagens com PBS-T foram realizadas.

A seguir, adicionaram 100 µL por orifício da solução de substrato orto-fenileno-diamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,5, sendo a reação interrompida após 15 minutos com HCl 2M (50µL/orifício). A leitura dos resultados foi realizada em um espectrofotômetro (Labsystem – Multiskan EX[®]) para microplacas, com filtro de 492 nm

4.8 Análise estatística

Os dados foram transformadas em $\log(x+1)$, e submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

As estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

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

5 RESULTADO

As amostras de soro das ovelhas vacinadas com os três produtos comerciais apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de anticorpos contra as toxinas C e D aos 15 dias após a aplicação da primeira dose dos toxóides (Tabelas 1 e 2, Figuras 1 e 2). No entanto, ocorreram diferenças significativas nas respostas vacinais quando avaliados os diferentes grupos experimentais neste mesmo momento. Assim, os níveis de anticorpos contra a toxina C dos animais do Grupo 2 (G2) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos do Grupo 1 (G1), que não diferiu do Grupo 3 (G3). Na resposta sorológica dos animais frente aos toxóides do tipo D ocorreu situação inversa, com superioridade significativa dos níveis de anticorpos do G1 quando comparados com os do G2 e G3, que não diferiram entre si.

A mesma tendência de queda significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina C foi constatada nos três grupos vacinados, quando avaliados aos 42 dias após a vacinação primária, com comportamento comparativo similar entre as três vacinas ao que ocorreu aos 15 dias da avaliação. Nesse mesmo momento (42 dias) da avaliação houve uma queda significativa ($p < 0,05$) no título de anticorpos contra a toxina botulínica tipo D do G1, equiparando-o com os títulos do G2 e G3 (Figura 2).

Em seguida à revacinação (42 dias), e quando avaliados os níveis de anticorpos aos 90 dias, observou-se um aumento significativo nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos vacinados, mantendo-se o mesmo padrão de comportamento comparativo dos dois momentos anteriores (Figura 1). Não houve variação significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina D nos três grupos vacinados após o reforço vacinal.

Na avaliação final, aos 180 dias, os animais vacinados com um dos toxóides bivalentes (G1) mantiveram a tendência apresentada desde o início do experimento, com níveis de anticorpos significativamente superiores contra a toxina C, quando comparados com os dois outros grupos vacinais. Nesse mesmo momento, os níveis séricos de anticorpos contra a toxina D dos grupos vacinados com os três produtos comerciais não apresentaram diferença significativa, diferindo, no entanto, do Grupo controle (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra a toxina tipo C de ovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalente e polivalente.

Dias	Grupos (média $\pm$ desvio padrão)			
	G1	G2	G3	GC
0	0,066 $\pm$ 0,042 dA	0,093 $\pm$ 0,064 dA	0,067 $\pm$ 0,059 dA	0,053 $\pm$ 0,045 aA
15	0,833 $\pm$ 0,332 aAB	1,038 $\pm$ 0,311 abA	0,675 $\pm$ 0,334 aB	0,045 $\pm$ 0,033 aC
42	0,336 $\pm$ 0,192 cAB	0,560 $\pm$ 0,400 cA	0,273 $\pm$ 0,135 cB	0,043 $\pm$ 0,040 aC
90	0,572 $\pm$ 0,208 bB	1,092 $\pm$ 0,249 aA	0,594 $\pm$ 0,271 abB	0,063 $\pm$ 0,058 aC
180	0,479 $\pm$ 0,219 bcB	0,826 $\pm$ 0,392 bA	0,414 $\pm$ 0,122 bcB	0,034 $\pm$ 0,046 aC

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

G1 = Vacina bivalente 1; G2 = Vacina bivalente 2; G3 = Vacina polivalente 3 e GC = Grupo controle.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra a toxina tipo D de ovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalente e polivalente.

Dias	Grupos (média $\pm$ desvio padrão)			
	G1	G2	G3	GC
0	0,095 $\pm$ 0,063 cA	0,093 $\pm$ 0,062 bA	0,062 $\pm$ 0,058 cA	0,041 $\pm$ 0,037 aA
15	0,557 $\pm$ 0,231 aA	0,294 $\pm$ 0,151 aB	0,320 $\pm$ 0,142 aB	0,028 $\pm$ 0,018 aC
42	0,258 $\pm$ 0,110 bA	0,219 $\pm$ 0,058 aA	0,193 $\pm$ 0,080 abA	0,069 $\pm$ 0,021 aB
90	0,269 $\pm$ 0,125 bA	0,233 $\pm$ 0,071 aA	0,301 $\pm$ 0,205 abA	0,081 $\pm$ 0,054 aB
180	0,201 $\pm$ 0,095 bA	0,241 $\pm$ 0,057 aA	0,177 $\pm$ 0,046 bA	0,060 $\pm$ 0,030 aB

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

G1 = Vacina bivalente 1; G2 = Vacina bivalente 2; G3 = Vacina polivalente 3 e GC = Grupo controle.

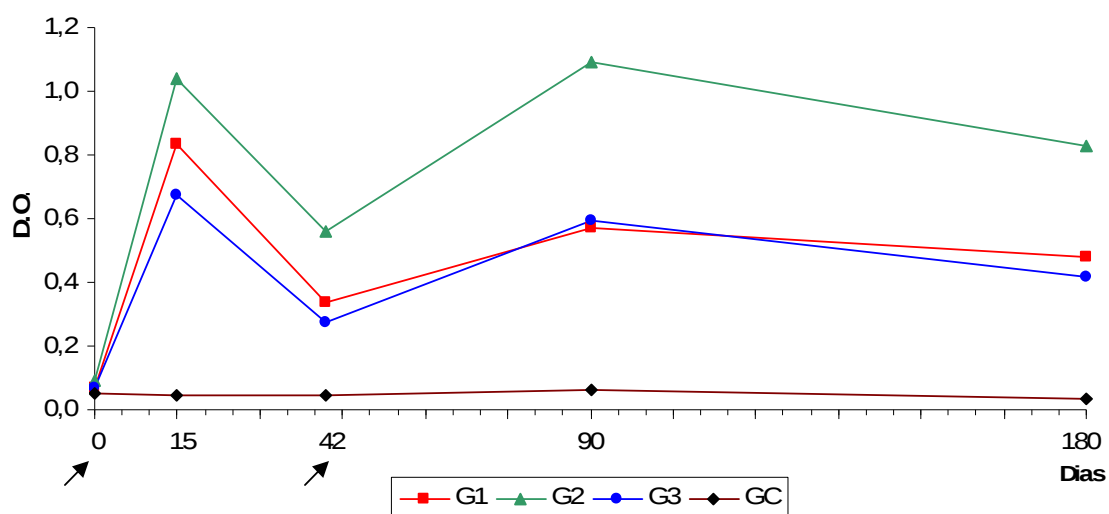


FIGURA 1 – Níveis de anticorpos (IgG) contra a toxina botulínica tipo C em ovinos vacinados com dois toxóides botulínicos bivalentes distintos (G1 e G2) e uma vacina polivalente contra clostridioses contendo os dois toxóides (G3), após a primovacinação e o reforço (↗).

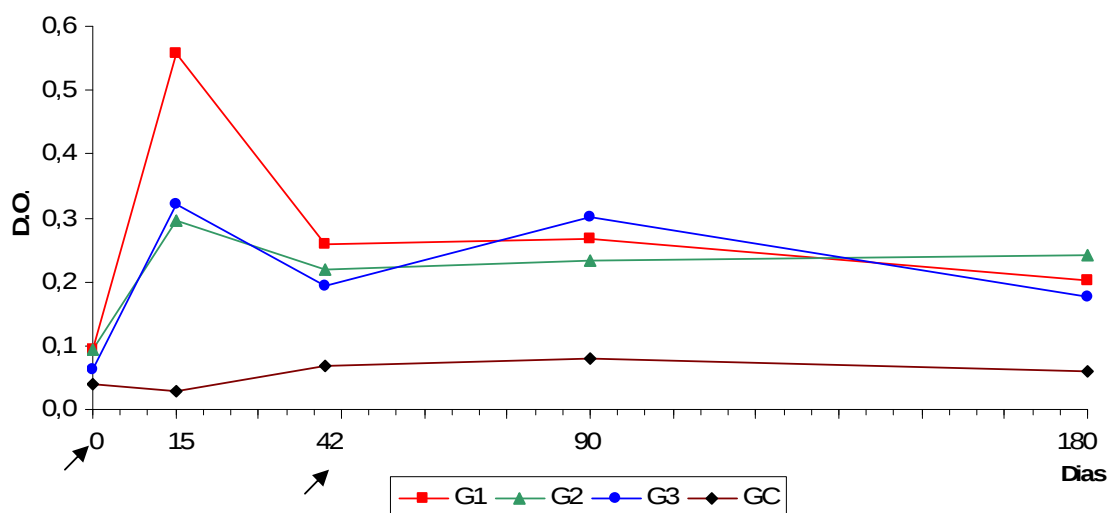


FIGURA 2 - Níveis de anticorpos (IgG) contra a toxina botulínica tipo D em ovinos vacinados com dois toxóides botulínicos bivalentes distintos (G1 e G2) e uma vacina polivalente contra clostridioses contendo os dois toxóides (G3), após a primovacinação e o reforço (↗).

6 DISCUSSÃO

Há um consenso de que os níveis de anticorpos séricos contra as toxinas botulínicas C e D determinam o grau de eficiência da vacinação como medida profilática da intoxicação botulínica em ruminantes. Embora não seja conhecida a quantidade de toxina que os animais ingerem em surtos naturais da enfermidade, da mesma forma que os títulos mínimos protetores para as toxinas C e D, é desejável que as vacinas comerciais contenham uma quantidade suficiente de toxóides para desencadear o mais alto nível possível de imunidade, pois quanto maior os títulos de anticorpos séricos, maior é a resistência dos animais ao desafio experimental com as toxinas (JANSEN et al., 1976).

Para uma melhor avaliação, seria necessário estimar o grau de proteção oferecido pelas vacinas testadas, fato extremamente difícil, pois seria imprescindível a ocorrência de um surto da enfermidade durante o experimento, com acompanhamento de animais sadios e doentes. Bovinos que apresentaram níveis sorológicos acima de 0,33 unidades de ELISA não foram acometidos pela toxina do tipo D, em três surtos ocorridos em condições naturais (STEINMAN et al. 2006).

A existência de homologia ou não entre as cepas usadas para a produção de antígenos com as cepas vacinais é desconhecida, não tendo sido objeto do presente estudo. No entanto, de acordo com Almeida et al. (2000) as amostras de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D utilizadas para a produção de imunógenos no Brasil apresentaram um alto grau de homologia sorológica entre elas. A homologia entre as cepas não interferiu decisivamente na magnitude da resposta de níveis de anticorpos das diferentes vacinas testadas, devendo esta ser atribuída ao processo tecnológico de fabricação e à quantidade de toxóides efetivamente presentes nos produtos comerciais.

É importante ressaltar que as vacinas antibotulínicas comercializadas no país são fiscalizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabeleceu por meio da Instrução Normativa nº 23 (Brasil 2002) as normas para produção e controle das vacinas antibotulínicas e estabelecendo, por meio da vacinação de cobaias, que os soros examinados pela prova de soroneutralização deverão apresentar níveis mínimos de 5 UI/mL para a antitoxina C e 2 UI/mL para a antitoxina D. No entanto, os níveis sorológicos de anticorpos desencadeados pela vacinação de cobaias são significativamente superiores aos dos bovinos (FONSECA, 2001). Embora as vacinas

sejam fiscalizadas pelo MAPA, permanece obscura a informação sobre os níveis mínimos de anticorpos protetores diante dos desafios naturais da intoxicação.

O protocolo de revacinação aos 42 dias adotado no presente experimento foi fundamentado na informação de Fonseca (2001), que comprovou que a revacinação em bovinos, quando efetuada aos 42 dias, é mais eficiente quando comparada com o protocolo de 30 dias em relação à toxina D. No entanto, o presente trabalho verificou que em ovinos a resposta sorológica ao toxóide C apresentou um aumento significativo ($p < 0,005$) após os 42 dias, que se manteve até os 6 meses observados. Em contrapartida, a toxina D não apresentou variações significativas ($p < 0,005$) após o reforço vacinal, sugerindo assim que seria desnecessário ser feito o reforço vacinal em ovinos. Entretanto esse questionamento não pode ser solucionado por não haver grupo de animais que não recebeu uma dose única.

As vacinas avaliadas no presente estudo apresentaram níveis de anticorpos elevados em relação aos animais não vacinados, permanecendo esses níveis até os seis meses, oferecendo assim uma resposta humoral linear aos animais. Em bovinos, as vacinas apresentam comportamentos diferentes entre elas (BROW et al. 1999, FONSECA 2001, LOBATO et al. 1999). O presente trabalho concluiu que existe diferença na resposta imune entre as vacinas, em relação à toxina C. Entretanto, em relação à toxina D, uma das vacinas bivalentes (G1) induziu níveis de anticorpos superiores aos 15 dias, igualando-se aos 42 dias e mantendo-se até os 180 dias.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles communes al hombre y a los animals**. Washington: OPS/OMS. 1986. 989 p.
- ALMEIDA A.C; ABREU, V.L.V.; LOBATO, F.C.F. Perfil sorológico das amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D utilizadas para a produção de imunógenos no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 52, n. 2, p. 91-95, 2000.
- ATASSI, M.Z.; OSHIMA, M. Struture, activity and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 219-260, 1999.
- BENNETS, L.A.; HALL, H.Y.B. Botulism of sheep and cattle in western Australia: it's cause and prevention by immunization. **Aust. Vet. J.**, v. 17, p. 105-118, 1938.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 23, 2002. **Diario Oficial Da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de mar. 2002. Seção 1, p. 10
- BROWN, A.T.; GREGORY, A.R.; ELLIS, T.M.; HEARNDEN, M.N. Comparative immunogenicity os two bivalent botulinum vaccines. **Aust. Vet. J.**, v.77, n. 6, p. 388-391, 1999.
- BURGEN, A.S.V.; DICKENS, F.; ZATMAN, L.J. The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. **J. Physiol.** v. 109, n.1/2, p. 10-24, 1949.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H; LANGENEGGER, J.; DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.** v. 99, n. 5, p. 188-190, 1992.
- DUTRA, I.S. **Epidemiologia, quadro clínico e diagnóstico pela soroneutralização em camundongos do botulismo em bovinos no Brasil, 1989-2001**. 2001. 133 f. Tese (Livre Docência) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.
- DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J. Eficácia da Vaxall vacina botulínica bivalente na prevenção do botulismo em bovinos. **Hora Vet.**, v. 16, n. 93, p. 22-26, 1996.
- DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a “doença da vaca caída”: botulismo. **Hora Vet.**, v. 14, n. 84, p. 7-10, 1995.
- DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; SOUZA, A. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, no. 2, p.115-119, 2005.
- DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; ROSA, I.V; SOUZA, L.A.A.; NONATO, M.. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesq. Vet. Bras.**, 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 Immunol. Med. Micr. Biol.**, v. 24, n. 3, p. 369-372, 1999.

FILMER, J. F. Botulism in domestic animals in Western Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 13, p. 170-172, 1937.

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

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 e D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. **Aust. Vet. J.**, v. 73, n. 2, p. 55-61, 1996

GUNDERSEN, C.B. The effects of botulinum toxin on the synthesis, storage and release of acetylcholine. **Prog. Neurobiol.** v. 14, n. 2/3, p. 99-119, 1980.

HOGG, R.A.; WHITE, V.J.; SMITH, G.R. Suspected botulism in cattle associated with poultry litter. **Vet. Rec.**, v. 126, n. 19, p. 476-479, 1990.

JANSEN, B.C.; KNOETZE, P.C.; VISSER, F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* type C e D toxóids. **Onderstepoort. J. Vet. Res.**, v. 43, n. 4, p. 165-174, 1976.

JEAN, D.; FECTEAU, G.; SCOTT, D.; HIGGINS, R.; QUESSY, S. *Clostridium botulinum* type C intoxication in feedlot steers being fed ensiled poultry litter. **Can. Vet. J.**, v. 36, n. 10, p. 626-628, 1995

KRIEK N.P.J.; ODENDAAL M.W. Botulism. In: COETZER J.A.W., THOMSON G.R., TUSTIN R.C. **Infectious diseases of livestock with special reference to southern África.** Cape town: Oxford University Press, 1994. p. 1354-1371.

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

LIDSEY, C.Y.; SMITH, M.W.; WEST, M.W.; BOLES, J.W.; BROWN, J.E. Evaluation of a botulinum fragment C-based ELISA for measuring the humoral immune response in primates. **Biological.**, v.31, n. 1, p.17-24, 2003.

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

LOBATO, F.C.F.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V.; SILVA, A.N.; NASCIMENTO, R.A.; MARTINS, N.E. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóide botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 25-27, 1999.

MANSON, J.H; STEYN, H.P; BISSCHOP, J.H.R. The Immunization of bovines against Lamsiekte. **J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 9, n. 2, p. 65-72, 1938.

MIDDLEBROOK, J.L.; SIMPSON, L.L. **Cell surface receptors for protein toxins in botulinum neurotoxin and tetanus toxin**. New York; Academic Press, 1989, p.95-119.

PRANTER, W. Results of potency tests of a vaccine against *Clostridium botulinum* type C by different methods. **Dev. Biol. Stand.**, v. 32, p. 185-191, 1976.

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, 54 f. Dissertação (Mestrado Interinstitucional em Biologia Parasitária) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-UFMS/ Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Campo Grande, 2001.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF K.W. **Clinica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RIBAS, A.I; FERREIRA, R.M.M.; MAZZER, R.C.; CIANIANI, R.B.; DUTRA, I.S. Detecção de esporos de *Clostridium botulinum* em costelas de cadáveres decompostos de bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 3., 1994, Olinda. **Anais...** Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p.142.

ROSSETO, O.; SEVESO, M.; CACCIN, P.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 27-41, 2001.

SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* toxins. **Pharmac. Ther.**, v.19, n. 2, p. 165-194, 1982.

SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System Institute, 1997, 1167p.

SMITH L.D. Botulismo en los mamíferos. In: SMITH, L.D. **Botulismo: el microorganismo, suas toxinas, la enfermedad**. Buenos Aires: Acribia, 1977. p. 175-193.

SOUZA, A.M.; MARQUES, D.F.; DÖBEREINER,J.; DUTRA, I.S. Esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D em cacimbas no Vale do Araguaia, Goiás. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 3, p. 133-138, 2006.

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. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.13, n. 8, p.862-868, 2006.

SWIFT, P.K.; WEHAUSEN, J.D; ERNEST, H.B.; SINGER, R.S; PAUL, A.M; KINDE, H.; ROCKE, T.E; BLEICH V.C. Desert Bighorn Sheep mortality due to presumptive type C botulism in California. **J. Wildl. Dis.**, v. 36, n. 1, p. 184-189, 2000.

TOKARNIA, C.H; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesqui. Agrop. Bras.**, v. 5, n. 3, p. 465-472, 1970.

VAN DER LUGT, J.J; DE WET, S.C; BASTIANELLO, S.S; KELLERMAN, T.S; JAARVELD L.P. Two outbreaks of type C and D botulism in sheep and goats in South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 66, n. 2, p. 77-82, 1995.

VETERINARY LABORATORIES AGENCY'S. Botulism in sheep associated with broiler litter. **Vet. Rec.**, v. 56, n. 5, p. 145-148, 2006.

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Resposta humoral de ovinos vacinados com toxóides botulínicos C e D¹

Fabiana L.C. Nobrega², Vera C.L.M. Curci³ e Iveraldo S. Dutra⁴

ABSTRACT.- Nobrega F.L.C., Curci V.C.M. & Dutra I.S. 2007. **Immune response in sheep vaccinated with botulinum toxoids C and D.** Resposta imune de ovinos vacinados com toxóides botulínicos C e D. *Pesquisa Veterinária Brasileira* __():__-__. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil. E-mail: isdutra@fmva.unesp.br

The immune response from sheep vaccinated against commercial botulinum toxoids was evaluated. The animals from Group (n=10) 1 and 2 were vaccinated with bivalents toxoids C and D, the Group (G) 3 received the polyvalent vaccine contained toxoids from other *Clostridium* and non-vaccinated animals were used as a control group. The booster dose was realized at 42 days after the initial dose and the antibodies levels against C and D toxins were evaluated by indirect ELISA, before of vaccination and 15, 42, 90 and 180 days after vaccination. At 15 days, the antibody level was significantly higher ($P<0,05$) against toxin C and D in all vaccinated groups, with antibodies levels against toxin C significantly higher ($P<0,05$) in the animals from G2 and against toxin D in the animals from G1. At 42 days of primary vaccination the antibodies levels against toxin C in the three vaccinated groups, while only the levels antibodies against toxin D from G1 showed a decrease. After the booster dose, at 90 days, a significantly higher in antibody levels against toxin C was observed, while no difference was observed against toxin D antibody levels. During 180 days, the G2, presented against toxin C antibody levels higher than presented by other groups, however against toxin D wasn't significant variation between the groups after the booster dose.

INDEX TERMS: Botulism, sheep, vaccine.

RESUMO.- Foi avaliada a resposta imune de ovinos vacinados com toxóides botulínicos comerciais. Os animais dos Grupos (n=10) 1 e 2 foram vacinados com os toxóides bivalentes C e D, o Grupo (G) 3 recebeu a vacina polivalente contendo bacterinas e toxóides de outros *Clostridium*, e os pertencentes ao Grupo Controle não foram vacinados. O reforço vacinal foi realizado aos 42 dias após a dose inicial, e os níveis séricos de anticorpos contra as toxinas C e D foram avaliados pelo teste de ELISA indireto antes da vacinação, 15, 42, 90 e 180 dias após a primovacinação. Aos 15 dias da avaliação todos os grupos vacinados apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) nos títulos de anticorpos contra as toxinas C e D, com amplitude significativamente superior nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos animais do G2 e contra a toxina D nos animais do G1. Aos 42 dias da vacinação primária houve uma queda significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos vacinados. Em relação à toxina D, somente o G1 apresentou queda nos níveis de anticorpos. Após o reforço vacinal dos grupos, quando avaliados aos 90 dias, observou-se novamente um aumento significativo nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos, entretanto não houve variação nos níveis de anticorpos contra a toxina D. Ao longo dos 180 dias, o G2 apresentou, contra a toxina C, níveis de anticorpos superiores ao apresentado pelos outros grupos, porém contra a toxina D não houve variação significativa entre os grupos analisados após o reforço vacinal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Botulismo, ovinos, vacina.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Araçatuba.

² Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680

³ Apta Regional Extremo Oeste - Avenida Alcides Fagundes Chagas, 122, Bairro Santana, Araçatuba, SP 16.055.240

⁴ Depto Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680. E-mail: isdutra@fmva.unesp.br

INTRODUÇÃO

O botulismo em ruminantes é uma intoxicação com alta letalidade provocada pela ingestão de neurotoxina previamente formada pelo *Clostridium botulinum*. Surtos da enfermidade em ovinos foram descritos em diversas regiões do mundo, sendo relacionados com deficiência de proteína ou fósforo (Smith 1977), alimentos (Van der Lugt et al. 1995), cama de frango (VLA 2006) e água contaminada (Swift et al. 2000), com o envolvimento dos tipos C ou D. Diversos episódios da enfermidade tem sido observados nesta espécie animal no Brasil (Dutra 2007).

Dentre as medidas profiláticas e de controle da intoxicação botulínica a vacinação é uma prática usual em diversos países do Hemisfério Sul (Kriek & Odendaal 2004), nos quais a ovinocultura destaca-se como atividade econômica, não dispensando, contudo, a necessidade de correção da deficiência de proteína ou de fósforo para a redução da deprevação de apetite, a correta destruição de cadáveres da pastagem e o uso de alimentos e água de boa qualidade.

Embora não se tenha a informação da quantidade de toxina ingerida pelos animais nos desafios naturais, pressupõe-se que sejam necessários níveis elevados de anticorpos para se ter uma proteção satisfatória do rebanho. Segundo Jansen et al. (1976), existe uma importante relação entre a resposta humoral de bovinos, desencadeada pelos toxóides C e D, e a proteção contra a intoxicação. No entanto, na literatura consultada não foi encontrada menção à resposta imune de vacina botulínica em ovinos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis sorológicos de imunoglobulina G, pelo teste de ELISA, de ovinos vacinados com três produtos comerciais, sendo dois bivalentes contendo toxóides botulínicos C e D e um polivalente contendo também bacterinas e toxóides de outros *Clostridium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas 40 ovelhas mestiças das raças Suffolk, Santa Inês e Dorper, com idade entre um e dois anos, divididas em 4 grupos de 10 animais. Os grupos 1 e 2 foram vacinados com os produtos em formulação bivalente contendo toxóides botulínicos tipos C e D, enquanto o grupo 3 foi vacinado com vacina polivalente contra as clostridioses. O Grupo 4 foi constituído de ovelhas não vacinadas, formando assim o grupo controle. As vacinas foram adquiridas no comércio, observando-se a conservação, o prazo de validade e a dose recomendada. A revacinação dos animais foi efetuada 42 dias após o estímulo primário, seguindo o protocolo de Fonseca (2001). Para avaliação da resposta imune foram colhidas amostras de soro sanguíneo dos animais, obtidas antes da aplicação da primeira dose da vacina e nos dias 15, 42, 90 e 180 após a dose primária. As amostras foram mantidas a -20°C até a realização do ensaio imunoenzimático.

As toxinas botulínicas (C e D) empregadas como antígenos foram obtidas de culturas de cepas de *C. botulinum*, provenientes da bacterioteca do Laboratório de Pesquisas em Enfermidades Infecciosas dos Animais, Unesp-Araçatuba. Após cultivo convencional em meio de cultura CMM o antígeno foi concentrado e semipurificado como descrito por Queiroz (2001) e 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 BCA de proteína (Pierce®).

O ELISA indireto (ELISA I) foi realizado para a detecção de anticorpos contra a toxina botulínica tipo C e D, segundo a metodologia descrita por Gregory et al. (1996) com algumas modificações. Soros na concentração de 5 UI/mL para o tipo C e 20 UI/mL para o tipo D, titulados pelo bioensaio em camundongo (Lanagro/MG), foram utilizados nos testes como controle positivo, e soros de cordeiros recém-nascidos privados de colostro como controle negativo. As imunoglobulinas foram detectadas utilizando-se Anti-IgG ovina, conjugada com peroxidase, na diluição de 1:10.000, e a reação desenvolvida com substrato orto-fenileno-diamina diluído em tampão citrato-fosfato, pH 4,5. As amostras foram testadas em duplicatas, e a leitura realizada em espectrofotômetro com filtro de 492nm. A média das DOs dos soros controles positivo e negativo foram empregadas como referência padrão na fórmula de ajuste das DOs dos soros testes.

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 homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e as diferenças foram consideradas

significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS

As amostras de soro das ovelhas vacinadas com os três produtos comerciais apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de anticorpos contra as toxinas C e D aos 15 dias após a aplicação da primeira dose dos toxóides (Quadros 1 e 2, Fig. 1 e 2). No entanto, ocorreram diferenças significativas nas respostas vacinais quando avaliados os diferentes grupos experimentais nesse mesmo momento. Assim, os níveis de anticorpos contra a toxina C dos animais do Grupo 2 (G2) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos do Grupo 1 (G1), que não diferiu do Grupo 3 (G3). Na resposta sorológica dos animais frente aos toxóides do tipo D ocorreu situação inversa, com superioridade significativa dos níveis de anticorpos do G1 quando comparado com o G2 e o G3, que não diferiram entre si.

A mesma tendência de queda significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina C foi constatada nos três grupos vacinados, quando avaliados aos 42 dias após a vacinação primária, com comportamento comparativo similar entre as três vacinas ao que ocorreu aos 15 dias da avaliação. Nesse mesmo momento (42 dias) da avaliação houve uma queda significativa ($p < 0,05$) no título de anticorpos contra a toxina botulínica tipo D do G1, equiparando-o com os títulos do G2 e G3 (Fig. 2).

Em seguida a revacinação (42 dias), e quando avaliados os níveis de anticorpos aos 90 dias, observou-se um aumento significativo nos níveis de anticorpos contra a toxina C nos três grupos vacinados, mantendo-se o mesmo padrão de comportamento comparativo dos dois momentos anteriores (Fig. 1). Não houve variação significativa nos níveis de anticorpos contra a toxina D nos três grupos vacinados após o reforço vacinal.

Na avaliação final, aos 180 dias, os animais vacinados com um dos toxóides bivalentes (G1) mantiveram a tendência apresentada desde o início do experimento, com níveis de anticorpos significativamente superiores contra a toxina C, quando comparado com os dois outros grupos vacinais. Nesse mesmo momento, os níveis séricos de anticorpos contra a toxina D dos grupos vacinados com os três produtos comerciais não apresentaram diferença significativa, diferindo, no entanto, do Grupo Controle (Quadro 2 e Fig. 2).

DISCUSSÃO

Há um consenso de que os níveis de anticorpos séricos contra as toxinas botulínicas C e D determinam o grau de eficiência da vacinação como medida profilática da intoxicação botulínica em ruminantes. Embora não seja conhecida a quantidade de toxina que os animais ingerem em surtos naturais da enfermidade, da mesma forma que os títulos mínimos protetores para as toxinas C e D, é desejável que as vacinas comerciais contenham uma quantidade suficiente de toxóides para desencadear o mais alto nível possível de imunidade, pois quanto maiores os títulos de anticorpos séricos, maior é a resistência dos animais ao desafio experimental com as toxinas (Jansen et al. 1976).

Para uma melhor avaliação, seria necessário estimar o grau de proteção oferecido pelas vacinas testadas, fato extremamente difícil, pois seria imprescindível a ocorrência de um surto da enfermidade durante o experimento, com acompanhamento de animais sadios e doentes. Bovinos que apresentaram níveis sorológicos acima de 0,33 unidades de ELISA não foram acometidos pela toxina do tipo D, em três surtos ocorridos em condições naturais (Steinman et al. 2006).

A existência de homologia ou não entre as cepas usadas para a produção de antígenos com as cepas vacinais é desconhecida, não tendo sido objeto do presente estudo. No entanto, de acordo com Almeida et al. (2000), as amostras de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D utilizadas para a produção de imunógenos no Brasil apresentaram um alto grau de homologia sorológica entre elas. A homologia entre as cepas não interferiu decisivamente na magnitude da resposta de níveis de anticorpos das diferentes vacinas testadas, devendo esta ser atribuída ao processo tecnológico de fabricação e à quantidade de toxóides efetivamente presentes nos produtos comerciais.

É importante ressaltar que as vacinas antibotulínicas comercializadas no país são fiscalizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabeleceu, por meio da Instrução Normativa nº 23 (Brasil 2002), as normas para produção e controle das vacinas antibotulínicas. Estabelecendo por meio da vacinação de cobaias, que os soros examinados pela prova de soroneutralização deverão apresentar níveis mínimos de 5 UI/mL para a antitoxina C e 2 UI/mL para a antitoxina D. No entanto, os níveis sorológicos de anticorpos desencadeados pela vacinação de cobaias são significativamente superiores aos dos bovinos (Fonseca 2001). Embora as vacinas sejam fiscalizadas pelo MAPA, permanece obscura a informação sobre os níveis mínimos de anticorpos protetores diante dos desafios naturais da intoxicação.

O protocolo de revacinação aos 42 dias adotado no presente experimento foi fundamentado na informação de Fonseca (2001), que comprovou que a revacinação em bovinos quando efetuada aos 42 dias é mais eficiente, quando comparada com o protocolo de 30 dias em relação à toxina D. No entanto, o presente trabalho verificou que em ovinos a resposta sorológica ao toxóide C apresentou um aumento significativo ($p < 0,005$) após os 42 dias, que se manteve até os 6 meses observados. Em contrapartida, a toxina D não apresentou variações significativas ($p < 0,005$) após o reforço vacinal, sugerindo assim que seria desnecessário ser feito o reforço vacinal em ovinos. Entretanto esse questionamento não pode ser solucionado, por não haver grupo de animais que não receberam uma dose única.

As vacinas avaliadas no presente estudo apresentaram níveis de anticorpos elevados em relação aos animais não vacinados, permanecendo esses níveis até os seis meses, oferecendo assim uma resposta humoral linear aos animais. Em bovinos, as vacinas apresentam comportamentos diferentes entre elas (Brow et al. 1999, Fonseca 2001, Lobato et al. 1999). O presente trabalho concluiu que existe diferença na resposta imune entre as vacinas, em relação à toxina C. Entretanto, em relação à toxina D, uma das vacinas bivalente (G1) induziu níveis de anticorpos superior aos 15 dias, igualando-se aos 42 dias e mantendo-se até os 180 dias.

Agradecimento. - À Profa. Tereza Cristina Cardoso da Silva pelo auxílio na preparação do antígeno e execução do ELISA, ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Pedro Leopoldo-MG pelas antitoxinas e ao Arnaldo dos Santos Vieira Filho (Presidente da ASPACO) por ceder seus animais para a realização do experimento.

REFERÊNCIAS

- Almeida A.C., Abreu, V.L.V, Lobato, F.C.F. 2000. Perfil sorológico das amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D utilizadas para a produção de imunógenos no Brasil. Arq. Bras. Méd. Vet. Zootc. 52:91-95.
- Brasil 2002. Regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o botulismo. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.
- Brow A.T., Gregory, A.R, Ellis T.M & Hearnden, M.N. 1999. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. Aust. Vet. J. 77:388-391.
- Dutra I.S. 2007. Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária, Unesp-Câmpus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680.
- Dutra I.S & Döbereiner J. 1996. Eficácia da Vaxall® vacina botulínica bivalente na prevenção do botulismo em bovinos. Hora Vet. 16:22-26.
- Fonseca F.S. 2001. Comparação da resposta humoral de bovinos e cobaios vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 55 p.
- Gregory A.R, Ellis T.M, Jubb T.F, Nickels R.J & Cousins D.V. 1996. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C e D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. Aust. Vet. J. 73:55-61.
- Jansen B.C, Knoetze P.C, Visser F. 1976. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. Onderstepoort J. Vet. Res. 43: 165-174.
- Kriek N.P.J & Odendaal M.W. 1994. Botulism, p. 1354-1371. In: Coetzer J.A.W, Thomson G.R & Tustin R.C. (ed.) Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, Oxford University Press, Cape town.
- Oguma K., Syuto B., Iida H., Kubo S. 1980 Antigenic similarity of Toxins Produced by *Clostridium botulinum* Type C and D Strains. Infection and Immunity 30:656-660.
- Oguma K., Syuto B., Agui T., Iida H., Kubo S. 1981 Homogeneity of Toxins Produced by *Clostridium botulinum* Type C and D Strains. Infection and Immunity 34:382-388.
- Queiroz R.A. 2001. Desenvolvimento de teste de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra as toxinas C e D de *Clostridium botulinum* em bovinos. Dissertação de Mestrado Interinstitucional em Biologia Parasitária - Universidade

- Federal do Mato Grosso do Sul-UFMS/ Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Campo Grande. 54 p.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Smith L.D. 1977. Botulismo em los mamíferos. In: Smith, L.D. (ed.) Botulismo: el microorganismo, suas toxinas, la enfermedad, Acribia, Zaragoza. , p. 175-193.
- Steinman A, Chaffer M, Elad D & Shpigel, N. 2006. Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against Botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. Clin. Vaccine Immunol. 13:862-868.
- Swift P.K., Wehausen J.D, Ernest H.B., Singer R.S, Paul A.M, Kinde H., Rocke T.E & Bleich V.C. 2000. Desert Bighorn Sheep mortality due to presumptive type C botulism in California. J. of Wildl. Dis. 36:184-189.
- Van der Lugt J.J, De Wet S.C, Bastianello S.S, Kellerman T.S & Jaarsveld L.P. 1995. Two outbreaks of type C and D botulism in sheep and goats in south Africa. J. S. Afr. Vet. Assoc. 66:77-82
- Veterinary Laboratories Agency's. 2006. Botulism in sheep associated with broiler litter. Vet. Rec. 56:145-148.

Quadro 1. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra a toxina tipo C de ovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalente e polivalente.

Dias	Grupos (média $\pm$ desvio padrão)			
	G1	G2	G3	GC
0	0,066 $\pm$ 0,042 dA	0,093 $\pm$ 0,064 dA	0,067 $\pm$ 0,059 dA	0,053 $\pm$ 0,045 aA
15	0,833 $\pm$ 0,332 aAB	1,038 $\pm$ 0,311 abA	0,675 $\pm$ 0,334 aB	0,045 $\pm$ 0,033 aC
42	0,336 $\pm$ 0,192 cAB	0,560 $\pm$ 0,400 cA	0,273 $\pm$ 0,135 cB	0,043 $\pm$ 0,040 aC
90	0,572 $\pm$ 0,208 bB	1,092 $\pm$ 0,249 aA	0,594 $\pm$ 0,271 abB	0,063 $\pm$ 0,058 aC
180	0,479 $\pm$ 0,219 bcB	0,826 $\pm$ 0,392 bA	0,414 $\pm$ 0,122 bcB	0,034 $\pm$ 0,046 aC

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

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3 e GC = Grupo controle

Quadro 2. Valores médios e desvio padrão da resposta sorológica (DO) contra a toxina tipo D de ovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalente e polivalente.

Dias	Grupos (média $\pm$ desvio padrão)			
	G1	G2	G3	GC
0	0,095 $\pm$ 0,063 cA	0,093 $\pm$ 0,062 bA	0,062 $\pm$ 0,058 cA	0,041 $\pm$ 0,037 aA
15	0,557 $\pm$ 0,231 aA	0,294 $\pm$ 0,151 aB	0,320 $\pm$ 0,142 aB	0,028 $\pm$ 0,018 aC
42	0,258 $\pm$ 0,110 bA	0,219 $\pm$ 0,058 aA	0,193 $\pm$ 0,080 abA	0,069 $\pm$ 0,021 aB
90	0,269 $\pm$ 0,125 bA	0,233 $\pm$ 0,071 aA	0,301 $\pm$ 0,205 abA	0,081 $\pm$ 0,054 aB
180	0,201 $\pm$ 0,095 bA	0,241 $\pm$ 0,057 aA	0,177 $\pm$ 0,046 bA	0,060 $\pm$ 0,030 aB

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

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3 e GC = Grupo controle

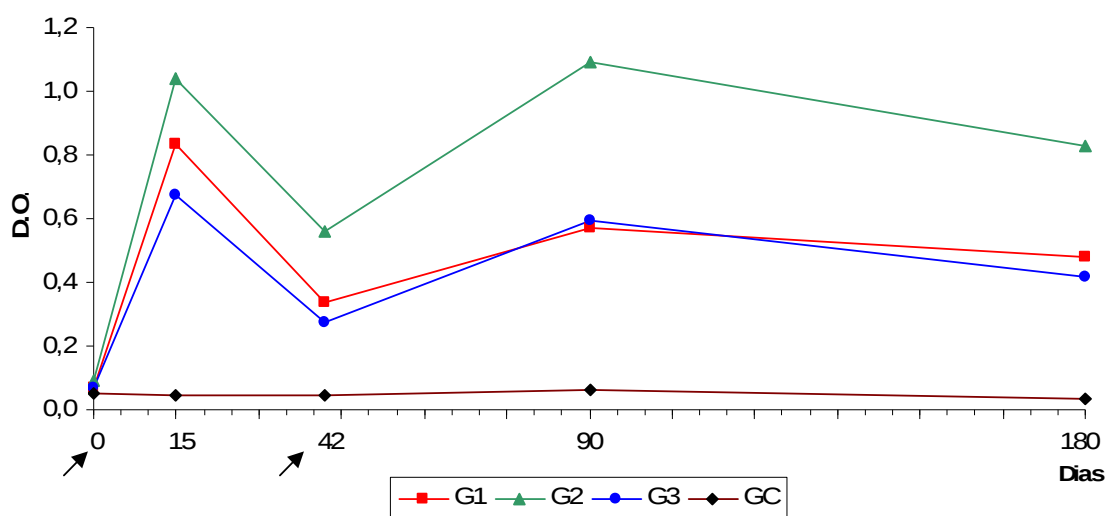


Fig. 1. Níveis de anticorpos (IgG) contra a toxina botulínica tipo C em ovinos vacinados com dois toxóides botulínicos bivalentes distintos (G1 e G2) e uma vacina polivalente contra clostridioses contendo os dois toxóides (G3), após a primovacinação e o reforço (↗).

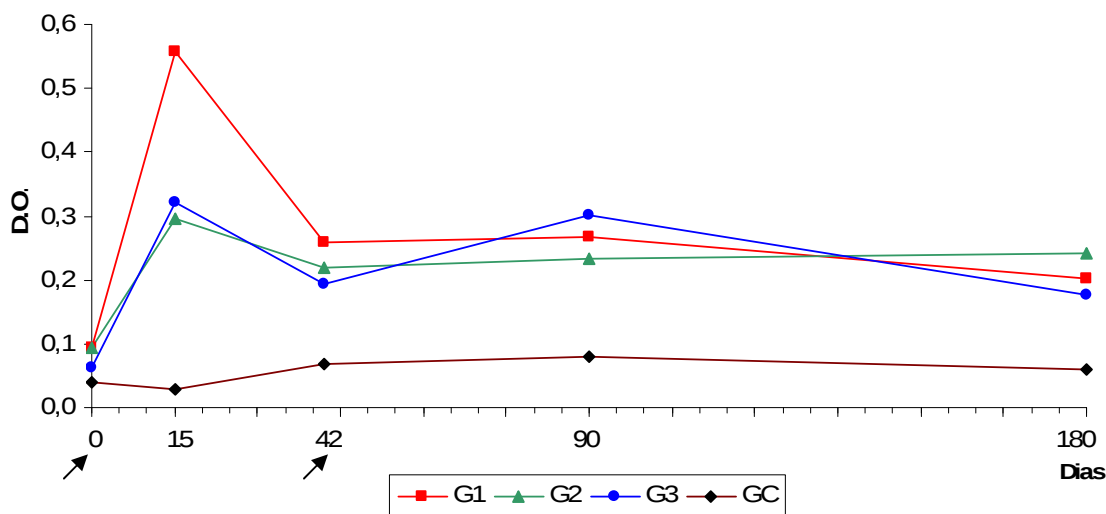


Fig. 2 Níveis de anticorpos (IgG) contra a toxina botulínica tipo C em ovinos vacinados com dois toxóides botulínicos bivalentes distintos (G1 e G2) e uma vacina polivalente contra clostridioses contendo os dois toxóides (G3), após a primovacinação e o reforço (↗).

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, *Resumo* e *Abstract* trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; *Resumo* e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.