

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE CORDEIROS SUBMETIDOS A
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNOPROFILAXIA DA
ENTEROTOXEMIA CAUSADA PELA AÇÃO DA TOXINA ÉPSILON DO
Clostridium perfringens TIPO D**

HENÍ FALCÃO DA COSTA

Médica Veterinária

Botucatu – SP
Agosto, 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE CORDEIROS SUBMETIDOS A
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNOPROFILAXIA DA
ENTEROTOXEMIA CAUSADA PELA AÇÃO DA TOXINA ÉPSILON DO
Clostridium perfringens TIPO D**

HENÍ FALCÃO DA COSTA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária, Área de
Medicina Veterinária Preventiva e Segurança
Alimentar.

Orientador: José Rafael Modolo

Co-orientador: Iveraldo dos Santos Dutra

Botucatu – SP
Agosto, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Costa, Hení Falcão da.

Avaliação sorológica de cordeiros submetidos a diferentes protocolos de imunoprofilaxia da enterotoxemia causada pela ação da toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D / Hení Falcão da Costa. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: José Rafael Modolo

Assunto CAPES: 50502000

1. Animais domésticos – Doenças – Diagnóstico. 2. Medicina veterinária preventiva.

Palavras-chave: Cordeiros; Enterotoxemia; Protocolos; Vacinação.

Nome da autora: Hení Falcão da Costa

Título: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE CORDEIROS SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE IMUNOPROFILAXIA DA ENTEROTOXEMIA CAUSADA PELA
AÇÃO DA TOXINA ÉPSILON DO *Clostridium perfringens* TIPO D

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Rafael Modolo

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

UNESP – FMVZ - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Cáris Maroni Nunes

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

UNESP – FOA - Araçatuba

Prof^a. Dr^a. Simone Baldini Lucheis

Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios

APTA – Bauru/SP

Data da Dissertação: 31/08/2010

*"É ocioso pensar sobre o justo e o injusto,
o certo e o errado e os feitos passados. O
útil é analisar, e se possível extrair uma
lição para o futuro".*

Gandhi

Dedico

Aos meus pais Gilberto e Neusa,

Aos meus irmãos Everton e Helder

Ao meu avô Miguel Falcão (in memoriam).

A minha madrinha Sandra Guimarães. (in memoriam).

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre comigo, me guiando em todas etapas de minha vida.

Ao meu amigo e orientador Prof. Rafael, pela amizade, conselhos, pelo amadurecimento e acima de tudo pela confiança em mim depositada desde os tempos de residência.

Aos meus pais Gilberto da Costa e Neusa Maria Falcão da Costa, exemplos de honestidade e perseverança, pelo amor incondicional, por terem me ensinado o valor da palavra EDUCAÇÃO. E também, por sempre confiarem nas minhas escolhas e no meu trabalho. Enfim me apoiarem na realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Heverton e Hélder, pela amizade, preocupação, apoio, carinho e por amenizarem durante esta etapa, meus períodos de ausência em momentos difíceis que enfrentamos.

Às minhas sobrinhas “princesinhas” Brenda e Giovana por tornarem os dias de nossa família ainda mais iluminados! E à minha cunhada Adriana por zelar tão bem das nossas princesinhas e do meu irmão Heverton.

Ao meu tio José Roberto da Costa “Zezito” pelo apoio e por saber que nossa família esteve sempre de braços abertos para acolhê-lo.

À minha amiga e pós-graduanda Selene Babboni “Little” pela ajuda incondicional durante o mestrado, enfrentando firme e forte os dias de chuva e frio intenso em 99% das colheitas das amostras, demonstrando a união da equipe do Planejamento!

À Adriana C. Pavan Vieira assistente acadêmico I do Planejamento de Saúde Animal da FMVZ, a minha gratidão mais que especial! Pudera que todas as pessoas tivessem a oportunidade de conviver com você, para verem o quão agradável torna-se a vida! Obrigada por me ajudar em todos os momentos, pelo convívio e por dividir momentos em família comigo!

Aos meus amigos da Turma XIII (Formandos 2006 – FMVA UNESP Araçatuba), em especial aos meus três grandes amigos Anivaldo Corte Júnior “Pano”, Leandro Venditti “Feka” e Beatriz Lucato “Buxexa” que mesmo a distância, muito me ajudaram, com palavras de carinho e apoio nos momentos de colheitas das amostras e dos conturbados momentos da execução laboratorial.

Às minhas amigas de longa data da minha cidade natal São Joaquim da Barra, Kamilinha, Sayne, Camila e Laila, que juntamente com minha família faziam dos meus raros momentos de volta para casa sempre alegres!

À amiga Larissa Bedore Zocal pelo apoio e amizade sincera!

Ao amigo Thiago Matos de Oliveira e sua cachorrinha Tequila “TT”, a qual me proporcionou momentos divertidos durante os primeiros meses do mestrado.

Aos integrantes da minha eterna república “Cantinho da Avó”, Paula Lima, Fernanda Gaio e Rafael Grobério pelo convívio agradável, uma verdadeira família!

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani pela ajuda no delineamento e realização da análise estatística do experimento, sempre de forma gentil, atenciosa e prestativa.

Ao amigo e atual residente do Planejamento de Saúde Animal e Saúde Pública da FMVZ UNESP Botucatu, Igor Adolfo Dexheimer Paploski pela ajuda nas colheitas de material a campo.

À técnica do Laboratório de Planejamento de Saúde Animal, Tânia Maria Martins.

À MSc. e técnica do laboratório de Enfermidades Infecciosas da FMVA – UNESP Araçatuba Rosa Maria Moraes Ferreira por me ajudar e não exitar em transmitir seus conhecimentos na área da microbiologia.

Ao meu co-orientador Prof. Adj. Iveraldo dos Santos Dutra, o qual sugeriu a necessidade de desenvolver esse estudo, pela ajuda no delineamento experimental e sugestões em todas as etapas.

À Prof^a. Adj. Cárís Maroni Nunes da FMVA – UNESP Araçatuba, por me “adotar”, transmitindo seus conhecimentos, desde as tentativas de produção da toxina até a padronização e interpretação do ELISA. Obrigada pelo apoio e por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis, tendo sempre uma palavra de força e perseverança!

Ao Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira da FMVA – UNESP Araçatuba por gentilmente ceder as instalações de seu laboratório de Endocrinologia Animal, pela confiança e por acreditar que eu seria capaz de concluir o trabalho.

À pós-doutoranda Sarita Ferrari Gobbo pelo auxílio e paciência durante a padronização do ELISA, assim como os mestrandos Silvana e Weslen Texeira e as

técnicas do laboratório de Endocrinologia Animal – Devani Mariano Pinheiro e Alessandra Alves Ragazzo por me acolherem e compartilharem momentos agradáveis durante a execução deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Mariano Fernandez Miykawa do Instituto Nacional de Tecnologia agropecuária (INTA) – Bariloche - Argentina, pela ajuda na interpretação e conversão dos valores do ELISA.

Ao médico veterinário do APTA – Pólo regional de Itapetininga Carlos Frederico Rodrigues, pela ajuda na escolha dos rebanhos utilizados no experimento.

Aos proprietários dos rebanhos utilizados no estudo: Giancarlo, Walter Gavião, Rubem Osta e a todos os funcionários que me auxiliaram – Flor e Zé, Danilo e Manoel, Ronaldo e aos funcionários do APTA – Pólo regional de Itapetininga.

Aos colegas da pós-graduação, em especial à amiga Michele Riciere Bastos pela agradável companhia e longas conversas.

À Fapesp pelo auxílio financeiro para execução do projeto (Processo nº 2008/10957-2).

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida (Edital universal nº 27/2007, Processo nº 550806/2008-3).

A todos que contribuíram para a realização deste experimento, o meu sincero agradecimento.

Lista de Quadros

Quadro 1- Tipificação do <i>Clostridium perfringens</i> quanto ao tipo de toxina	20
Quadro 2- Composição da vacina polivalente contra clostridioses adquirida no comércio e utilizada no experimento	52
Quadro 3- Distribuição dos cordeiros nos protocolos de vacinação de acordo com a idade à primovacinação	53
Quadro 4- Composição das vacinas polivalentes contra clostridioses adquiridas no comércio e utilizadas no experimento	70
Quadro 5- Distribuição dos cordeiros nos protocolos de vacinação de acordo com a idade à primovacinação	72

Lista de Tabelas

Tabela 1- Mediana e valores mínimo e máximo da resposta humoral dos cordeiros submetidos a diferentes protocolos de primovacinação contra enterotoxemia com vacina comercial polivalente. Botucatu-SP / 2010.....	58
Tabela 2- Mediana e valores mínimo e máximo da resposta humoral em cordeiros segundo a vacina, protocolo de vacinação e momento de avaliação. Botucatu/SP, 2010.....	78
Tabela 3- Medidas descritivas de anticorpos antitoxina épsilon (UI/ml) segundo grupo e momento de avaliação. Botucatu/SP, 2010.	95

Lista de Figuras

- Figura 1:** Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) dos cordeiros submetidos a diferentes protocolos de primovacinação com a mesma vacina comercial contra enterotoxemia.. 58
- Figura 2:** Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) de cordeiros submetidos ao protocolo de primovacinação aos 30 dias de idade com cinco vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses..... 79
- Figura 3:** Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) de cordeiros submetidos ao protocolo de primovacinação aos 45 dias de idade com cinco vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses..... 79
- Figura 4:** Média da concentração de anticorpos antitoxina épsilon em ovelhas vacinadas e não vacinadas e seus respectivos cordeiros. 96

Lista de abreviações

C. perfringens: *Clostridium perfringens*

UI/ml: unidade internacional por mililitros

ETX: toxina épsilon

FTIP: falha na transferência de imunidade passiva

TCB: tampão carbonato-bicarbonato

µg/ml: micrograma por mililitros

µl: microlitros

M: molar

°C: graus Celsius

PBS-T: phosphate buffered saline Tween

LPD: leite em pós desnatado

SUMÁRIO

Lista de quadros	ix
Lista de tabelas.....	x
Lista de figuras	xi
Lista de abreviações.....	xii
Sumário	xiii
Resumo	xvi
Abstract.....	xvii
CAPÍTULO I	18
1.0 INTRODUÇÃO.....	19
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Caracterização do <i>Clostridium perfringens</i> e a toxina épsilon	20
2.2. Enterotoxemia – a enfermidade.....	22
2.3. Enterotoxemia – avaliação sorológica	25
2.4. Enterotoxemia – prevenção	28
2.4.1 Papel da imunização passiva	29
2.4.2 Papel da imunização ativa	31
3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO II	45
Resposta sorológica de cordeiros submetidos a diferentes protocolos de primovacinação contra enterotoxemia	
RESUMO	46
ABSTRACT.....	47
1.0 INTRODUÇÃO.....	48
2.0 OBJETIVO	49
3.0 HIPÓTESE.....	50

4.0 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Local de realização do experimento e origem dos animais	51
4.1.1 Vacina comercial	51
4.1.2 Protocolos vacinais e colheitas de amostras sangüíneas	52
4.2 Detecção e quantificação de anticorpos antitoxina épsilon	53
4.2.1 Antígeno	54
4.2.2 Amostras de soro padrão	54
4.2.3 Técnica de ELISA-I	55
4.2.4 Análise estatística	56
5.0 RESULTADOS	57
6.0 DISCUSSÃO	59
7.0 CONCLUSÃO	60
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO III	42

**Resposta sorológica de cinco vacinas comerciais contra
enterotoxemia em cordeiros submetidos a dois protocolos de
primovacinação**

RESUMO	64
ABSTRACT	65
1.0 INTRODUÇÃO	66
2.0 OBJETIVO	67
3.0 HIPÓTESE	68
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 Local de realização do experimento e origem dos animais	69
4.1.1 Vacinas comerciais	69
4.1.2 Protocolos vacinais e colheitas de amostras sangüíneas	71
4.2 Detecção e quantificação de anticorpos antitoxina épsilon	73

4.2.1	Antígeno	73
4.2.2	Amostras de soro padrão	74
4.2.3	Técnica de ELISA-I	74
4.2.4	Análise estatística	75
5.0	RESULTADOS	76
6.0	DISCUSSÃO	80
7.0	CONCLUSÃO	81
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
CAPÍTULO IV		84
	Cinética de anticorpos colostrais contra enterotoxemia em cordeiros	
	ABSTRACT	85
	RESUMO	86
	INTRODUÇÃO	86
	MATERIAL E MÉTODOS	88
	Animais	88
	Técnica de ELISA-I	88
	Análise estatística	89
	RESULTADOS	90
	DISCUSSÃO	90
	CONCLUSÕES	91
	Agradecimentos	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE	97

COSTA, H.F. **Resposta sorológica de cordeiros submetidos a diferentes protocolos de imunoprofilaxia da enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D.** Botucatu, 2010. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A enterotoxemia causada pela ação da toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D é uma das causas mais comuns de óbitos em ovinos e caprinos de todo o mundo e geralmente os animais mais jovens e em boas condições nutricionais são os mais acometidos. Cordeiros jovens podem apresentar concentração sérica de anticorpos antitoxina épsilon em virtude de o microrganismo ser ubiqüitário do solo e trato digestivo dos animais. No entanto, tal concentração não é considerada protetora quando a enfermidade é desencadeada, sendo necessária a vacinação dos animais para proteção da enfermidade. No presente estudo foram testados diferentes protocolos de vacinação em cordeiros jovens com vacina comercial polivalente contra clostridioses. Avaliando-se a resposta sorológica pela técnica de ELISA-I, observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os protocolos vacinais, no entanto todos conferiram título considerado protetor nos animais avaliados. Quanto às cinco vacinas avaliadas frente a dois protocolos testados, todas apresentaram título considerado protetor, sendo que para duas delas, os títulos séricos foram mais elevados frente as demais. Utilizou-se a técnica ELISA-I também para avaliar e comparar a cinética de anticorpos antitoxina épsilon de cordeiros filhos de ovelhas não-vacinadas e vacinadas 30 dias antes da parição. Houve uma diferença significativa nas concentrações séricas de anticorpos antitoxina épsilon nos grupos de cordeiros, sendo o título do grupo de cordeiros, filhos de matrizes vacinadas, considerado protetor ($\geq 0,2\text{UI/ml}$) no período de avaliação.

Palavras-chave: enterotoxemia, cordeiros, vacinação, protocolos

COSTA, H.F. **Antibody response of lambs under different immunoprophylaxis protocols of enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* epsilon toxin type D.** Botucatu, 2010. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

*The enterotoxemia caused by the action of epsilon toxin produced by *Clostridium perfringens* type D is one of the most common causes of deaths in sheep and goats from around the world and usually the younger animals and in good nutritional conditions are most affected. Young lambs may have serum antibodies against epsilon antitoxin because the organism is ubiquitous in soil and in the digestive tracts of animals, but this concentration is not considered protective. Vaccination is essential for protection from disease. In this study we tested different vaccination protocols of young lambs with five commercial polyvalent vaccines against clostridial. Evaluating the antibody response by ELISA-I significant differences ($p < 0.05$) between vaccination protocols, were observed but all were considered protective. All the five evaluated vaccines by two protocol resulted in protective title, and two of the five tested vaccines showed higher titers against the others. We also used the ELISA technique to evaluate and compare the kinetics of epsilon antitoxin antibodies lambs of non-vaccinated and vaccinated ewe at 30 days before parturition. There was a significant difference in the serum concentrations of epsilon antitoxin antibodies in the groups of lambs, with protective title (≥ 0.2 IU / ml) in the group of lambs from vaccinated ewe, considered protective (≥ 0.2 IU / ml) in the evaluated period.*

Key-words: enterotoxaemia, lambs, vaccination, protocols.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

REVISÃO DE LITERATURA

1.0 INTRODUÇÃO

A toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D é a causa mais comum de quadros de enterotoxemia em ovinos e caprinos de todo o mundo, e geralmente os animais mais jovens e em boas condições nutricionais são os mais acometidos (JANSEN, 1967; BLACKWELL et al., 1983; FLEMING, 1985; FINNIE, 2003).

A toxina age inicialmente no intestino produzindo alterações morfológicas e fisiológicas (FERNANDEZ-MIYKAWA; UZAL, 2003) e após a absorção intestinal, age sistematicamente, no caso dos ovinos, produzindo diversas alterações principalmente neurológicas e pulmonares nos quadros super agudos da enfermidade (FINNIE, 2003).

Como uma das mais importantes enfermidades entéricas dos pequenos ruminantes, a enterotoxemia é responsável por consideráveis perdas econômicas na cadeia produtiva de leite e carne (FERNANDEZ-MIYKAWA et al., 2007), com prevalência variando entre 24,13% e 100% relatada em diversos países (EL IDRISSE; WARD, 1992; GRECO et al., 2005). Considerando-se o aumento na ingestão de dietas altamente energéticas em cordeiros jovens confinados para o abate e conseqüente risco de desencadearem quadros de enterotoxemia, a vacinação do rebanho, é uma das principais medidas de prevenção da enfermidade.

No entanto, ainda não está elucidado se a antecipação da primovacinação nesses animais promove níveis séricos considerados satisfatórios para a prevenção da enfermidade e nem qual o comportamento das vacinas comerciais frente tal alteração de protocolo vacinal.

Frente a importância econômica e sanitária da enterotoxemia e a escassez de estudos criteriosos relacionados à mensuração da resposta sorológica de cordeiros contra a toxina épsilon produzida pelo *C. perfringens* tipo D, motivaram a realização do presente estudo.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do *Clostridium perfringens* e a toxina épsilon

Clostridium perfringens compreende um grupo de microrganismos Gram-positivos, bastonetes, anaeróbios, formadores de esporos e produtores de exotoxinas (QUINN et al., 1992). É componente ubiqüitário da microbiota intestinal do homem e de outros animais (SONGER et al., 1996) e comumente encontrado no solo, água e ar (JUNEJA et al., 2003).

Mais de 17 toxinas do *C. perfringens* tem sido descritas na literatura (MIHELEC et al., 1978; SMITH, 1979; HATHEWAY, 1990). A espécie é classificada em cinco toxinotipos A, B, C, D e E (NILLO, 1980; QUINN et al., 1992) baseada na produção de quatro principais toxinas a alfa, beta, épsilon e iota (SMITH, 1979) (Tabela 1). Cada toxinotipo de *C. perfringens* está associado a uma determinada doença, quer seja humana ou animal (SMEDLEY et al., 2004). Duas outras toxinas (enterotoxina e toxina beta 2) também podem ser produzidas por todos os tipos de *C. perfringens*, embora não sejam utilizadas para a sua tipificação (GARMORY et al., 2000).

Quadro 1: Tipificação do *Clostridium perfringens* quanto ao tipo de toxina produzida.

Toxinas				
Tipo	Alfa	Beta	Épsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++ Produção da fração de toxina predominante.

+ Produção em baixa quantidade.

- Não-produção.

Extraída de NILLO, 1980.

De maneira geral, as toxinas produzidas pelo *C. perfringens* causam efeitos devastadores no organismo do hospedeiro (LEWIS, 2000). Para Smedley et al. (2004), a variação no tipo de toxina produzida influencia as

propriedades de virulência das cepas de *C. perfringens*, o que pode explicar, em parte, a versatilidade patogênica deste microrganismo em causar diversas enfermidades, em animais ou humanos.

A toxina épsilon (ETX) é produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo B e D. Considerada a terceira toxina clostrídica mais potente, perdendo somente para as neurotoxinas botulínica e tetânica (PAYNE et al., 1997), a ETX é responsável pelo desenvolvimento de quadros fatais de enterotoxemia em ovinos, caprinos, bovinos jovens e ocasionalmente em outros animais domésticos (SONGER et al., 1996; NAGAHAMA et al., 1993). A absorção da toxina pela mucosa intestinal e sua disseminação em todos os órgãos pela corrente sanguínea provoca elevação da pressão arterial e edema em vários órgãos (SONGER et al., 1996; SAKURAI et al., 1983). Devido ao fato desta toxina ser potencialmente ativa em humanos, o *National Institutes of Health and the Centers of Disease Control* classifica a ETX como agente biológico da categoria B (MANTIS, 2005).

A toxina épsilon consiste em uma proteína composta por 311 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 32,7 kDa, sintetizada e secretada na forma de prototoxina. Sua ativação pode ocorrer após a ação da tripsina ou quimiotripsina (HUNTER et al., 1992; MIYATA et al., 2001), zincometaloproteinase produzida pelo *C. perfringens* tipos B e D (MINAMI et al., 1997) ou ainda por algumas outras toxinas sintetizadas por este microrganismo porém pouco estudadas, aumentando significativamente sua toxicidade (BULLEN, 1970; HAUSCHILD, 1971; NILLO, 1986; SAKURAI et al., 1997; ROOD, 1998).

Produzida normalmente em pequena quantidade no intestino de animais, a toxina épsilon, nessa condição, não acarreta nenhum efeito deletério e até estimula a formação de anticorpos específicos (BLACKWELL et al., 1983). Entretanto, concentrações elevadas dessa toxina provocam um aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente sua absorção pela circulação sistêmica (BULLEN, 1970) desencadeando hiperemia, elevação da pressão sangüínea (NAGAHAMA et al., 1993), aumento da permeabilidade vascular (MORGAN et al., 1975) e edemaciação dos rins, pulmões e excesso

de líquido no pericárdio, além de manifestações neurológicas tais como convulsões e opistótono (McDONEL, 1980; SAKURAI et al., 1983). As informações sobre o mecanismo de ação da toxina épsilon ainda são escassas. Finnie et al. (1999) relataram que a toxina, por produzir um aumento da permeabilidade vascular, após atingir o tecido cerebral, exerce efeito citotóxico diretamente nos neurônios dos ratos. A ETX pode ainda atravessar a barreira hemato-encefálica e causar edemas perivasculares, danos neuronais e liberação excessiva de glutamato pelos neurônios do hipocampo (MIYAMOTO et al., 2000), além de um possível efeito acumulativo em determinadas regiões do cérebro (PAYNE et al., 1997).

Fernandez-Miyakawa; Uzal (2003) evidenciaram danos histológicos em alças do cólon de ovinos e caprinos provocados pela ação da toxina épsilon, e quando compararam a capacidade de absorção desta toxina entre as espécies, esta foi mais prontamente absorvida pelo intestino de caprinos, evidenciada pelas alterações histopatológicas mais marcantes no cólon de caprinos que de ovinos, duas horas após a administração intraduodenal da toxina.

2.2. Enterotoxemia – a enfermidade

A enterotoxemia, uma das mais importantes enfermidades entéricas que acomete os ruminantes domésticos, determina consideráveis perdas econômicas à cadeia produtiva de carne e leite (FERNANDEZ-MIYAKAWA et al., 2007). A causa dessa enteropatia foi estabelecida pela primeira vez em 1932, na Austrália, quando a toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D foi detectada no conteúdo intestinal de carneiros (GRINER et al., 1956). Enterotoxemia é uma das mais freqüentes ocorrências de enfermidades que acometem ovinos e caprinos de todo o mundo (SHANKS, 1949; NILO, 1980; SMITH; SHERMAN, 1994; KRIEK et al., 1994; SONGER, 1998; UZAL, 2004). Estudos realizados em diversos países relatam uma prevalência variando entre 24,13% e 100% (EL IDRISSEI; WARD, 1992; GRECO et al., 2005). Embora outros tipos de *Clostridium perfringens* (A, B e C) tenham sido diagnosticados como causas de enfermidades em ovinos, o tipo D ganha destaque por ser isolado na maioria dos casos (ÖZTÜRK, 1996; ÖZCAN; GÜNÇAY, 2000).

Também conhecida como doença do rim polposo, doença da super-alimentação ou morte súbita, a enterotoxemia é uma enfermidade infecciosa não contagiosa responsável por altas taxas de mortalidade e que pode acometer pequenos ruminantes de qualquer idade. Entretanto, os jovens entre três e dez semanas de idade, em boas condições nutricionais são particularmente mais suscetíveis (KRIEK et al., 1994; SMITH; SHERMAN, 1994; SONGER, 1998). Em bovinos, a bactéria está presente já nos primeiros dias de vida e associada à síndrome da diarreia neonatal em bezerros de corte (FERRAREZI et al., 2008); considerada como uma das causas predominantes de morte em animais desmamados até 10 meses de idade, geralmente aqueles alimentados com ração rica em grãos em confinamentos (SONGER et al., 1996).

Diversos fatores são citados como predisponentes para a ocorrência da doença do rim polposo, tais como aqueles que afetam o ambiente intestinal: a diminuição do trânsito intestinal, alterações bruscas na dieta alimentar, mudanças de pastagens pobres para luxuriantes, alimentação com diversos tipos de grãos e forragens (trigo, alfafa), dietas muito ricas em proteínas e/ou energia, aumento no conteúdo de carboidratos fermentáveis na ração (SEIFERT; BÖHNEL, 1994; SMITH; SHERMAN, 1994). No entanto, Uzal et al. (1994) relataram surtos de enterotoxemia em caprinos criados sob condições extensivas, sem que nenhuma mudança brusca de alimentação tivesse ocorrido, o mesmo podendo ser extrapolado para os ovinos. Diversos outros fatores que causam distúrbios intestinais, ainda não descritos, podem ser predisponentes para a ocorrência da enterotoxemia.

Segundo Pugh (2002), nos pequenos ruminantes, a enterotoxemia apresenta-se naturalmente sob três formas clínicas: superaguda, aguda e crônica. Na forma superaguda, mais freqüente em animais jovens, há morte súbita sem que nenhum sinal clínico tenha sido observado. A forma aguda, mais comum em animais adultos, caracterizada por diarreia, opistótono e convulsão e a forma crônica, caracteriza-se por perda de peso e diarreia, podendo culminar em recuperação ou óbito do animal.

São escassos os relatos da prevalência de casos de enterotoxemia em ovinos, o que não deve ser encarado como uma enfermidade rara ou esporádica, mas sim como uma enfermidade sub-diagnosticada em virtude de, na maioria dos casos se apresentar na forma super-aguda, ou ainda, por ser diagnosticada erroneamente como outra enfermidade. No Paquistão, Suhail et al. (2003) avaliando um rebanho de cordeiros jovens, observaram prevalência da enfermidade acima de 40%. Já Greco et al. (2005) encontraram 16% de prevalência nos cordeiros do sul da Itália.

Já na espécie caprina as descrições de relatos de casos de enterotoxemia são mais freqüentes, como os da Argentina (UZAL et al., 1994), Austrália (OXER, 1956), Canadá (BLACKWELL; BUTLER, 1992) e Brasil (COLODEL et al., 2003).

Embora a doença em ovinos e caprinos seja causada pelo mesmo agente etiológico, ou seja, pela mesma toxina épsilon, existem diferenças significativas entre as síndromes enterotoxigênicas nas duas espécies (SMITH; SHERMAN, 1994).

Em geral, ovinos afetados por quadros agudos de infecção por *C. perfringens* tipo D tem morte súbita, precedida ou não por complicações neurológicas como convulsão, cegueira ou coma (SONGER et al., 1996; FINNIE, 2003). Complicações gastrintestinais causadas pela ação da toxina épsilon na espécie ovina são brandas ou até mesmo raras (SONGER et al., 1996). Em contraste, caprinos acometidos pela enfermidade sofrem de enterocolite que pode ser severa e letal para quadros agudos ou auto-limitante nos casos crônicos (UZAL et al., 1994).

Na reprodução experimental da enterotoxemia em ovinos e caprinos, nos quais infundiu-se, por via intraduodenal, cultura líquida de *Clostridium perfringens* tipo D, Blackwell et al. (1991) observaram diferenças na manifestação clínica da enfermidade entre as duas espécies. Os cordeiros apresentaram letargia, sinais neurológicos evidentes, diarreia e morte, sendo as principais lesões patológicas associada com o cérebro (encefalomalácia simétrica bilateral) e pulmões (presença de conteúdo catarral). Nos caprinos

observaram diarreia, distensão abdominal, letargia, sonolência e morte súbita após 6 horas da infusão.

Apesar da toxina épsilon ser endoteliotóxica, o receptor específico para toxina épsilon ainda não foi totalmente identificado. Entretanto, a presença de um receptor específico, particularmente no cérebro e nos rins, tem sido sugerida pela captação da referida toxina (BUXTON et al., 1976). Nagahama; Sakurai (1991) sugeriram que tal ligação da toxina épsilon ocorreria na fração sinaptossomal, provavelmente devido à formação de um poro na membrana plasmática neuronal como consequência da oligomerização (MIYATA et al., 2001; 2002).

Roedores têm sido utilizados como modelo experimental como fonte de estudo dos efeitos neurológicos da toxina épsilon (FINNIE et al., 1999). Autores defendem o modelo de explanação de que as lesões cerebrais, nos quadros agudos, ocorrem devido a ação da toxina no endotélio celular, com formação de edema perivascular, seguido por hipóxia e necrose do tecido perivascular (BUXTON et al., 1978; NAGAHMA; SAKURAI, 1991). Entretanto, Finnie et al. (1999) demonstraram que a toxina épsilon também pode se espalhar pelo cérebro e agir diretamente nos neurônios, produzindo degeneração e necrose destas células nos casos de intoxicação sub-aguda ou crônica em ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Adamson et al. (2005).

Uzal et al. (2004) reproduziram experimentalmente a forma super aguda da enterotoxemia em ovinos por meio da infusão intraduodenal de cultura de *C. perfringens* tipo D. Os animais desenvolveram dificuldade respiratória, decúbito com movimentos de pedalagem, balidos de dor, convulsões, dificuldade em caminhar devido a alterações na visão e opistótono, num período que variou de 30 minutos até 26 horas após a inoculação da toxina épsilon.

2.3. Enterotoxemia – avaliação sorológica

Diversos tratados descrevem várias modalidades diagnósticas para enfermidades clostridiais (SONGER et al., 1996). A confirmação do diagnóstico não é, entretanto, sempre fácil, já que os microrganismos causadores são comensais no trato intestinal dos animais (QUINN et al., 1992). Os principais

componentes do diagnóstico da enterotoxemia causada por *C. perfringens* em animais domésticos baseiam-se na avaliação de sinais clínicos, alterações macroscópicas e microscópicas de tecidos, cultura bacteriológica e detecção de toxinas em amostras de necropsia e em sobrenadantes de culturas puras isoladas e cultivadas em meios seletivos (HOEFLING, 1990). As lesões renais (rim polposo) não são características, portanto, encontrar rim polposo em ovinos não estabelece diagnóstico definitivo de enterotoxemia. Diante disso, o diagnóstico definitivo desta enfermidade necessita da confirmação laboratorial (UZAL, 2004).

Os achados histopatológicos como microangiopatia cerebral, caracterizada por acúmulo perivascular de material eosinofílico proteináceo e hemorragias principalmente na cápsula interna, tálamo e pedúnculos cerebelares caracteriza a enterotoxemia em ovinos, sendo raramente encontrada em casos de enterotoxemia em caprinos (BUXTON, 1978; UZAL et al., 1997a). Na espécie caprina é mais freqüente a ocorrência de lesões intestinais (UZAL; KELLY, 1996; UZAL et al., 1997a).

O diagnóstico confirmatório da enterotoxemia baseia-se na associação da detecção desta toxina no conteúdo intestinal e teste *in vivo*, sendo o padrão utilizado a soroneutralização em camundongos. Apesar de ser reconhecido pela sua sensibilidade e especificidade, trata-se de um método lento e relativamente caro, pois requer grande número de animais, além de gerar discussões éticas por parte de grupos humanitários e pesquisadores que visam o bem estar animal (PARREIRAS et al., 2002).

Como alternativa de substituição, um teste *in vitro* pode ser adotado, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), um método sensível, específico, ético e rápido que necessita de poucas horas para a obtenção dos resultados (UZAL et al., 2003). A detecção da toxina épsilon pela técnica de ELISA revelou ser o teste diagnóstico indicado para substituir a soroneutralização em camundongos (NAYLOR et al., 1987; ROSSKOPF-STREICHER, 2004).

A técnica de ELISA Indireto, utilizada por Uzal et al. (1997a) para a detecção de níveis de antitoxina épsilon no soro sanguíneo de caprinos vacinados contra a enterotoxemia, apresentou alta correlação quando

comparada com a técnica tradicional de soroneutralização em camundongos. Os autores concluíram que essa técnica pode ser utilizada para a verificação de níveis de anticorpos séricos de caprinos em um pequeno intervalo de tempo e sem a necessidade da utilização de animais de laboratório.

Uzal et al. (1997b) encontraram alta correlação entre as técnicas de ELISA indireto e competitivo na detecção de anticorpos anti-toxina épsilon em caprinos.

Sojka et al. (1989) padronizaram um ELISA para quantificar antitoxina épsilon em amostras de soro de coelhos imunizados, visando diminuir o número de animais experimentais e aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste. Ebert et al. (1999) desenvolveram duas técnicas de ELISA para detectar anticorpos específicos contra as toxinas beta (ELISA de captura) e épsilon (ELISA competitivo) do *Clostridium perfringens* e obtiveram alta correlação entre o teste *in vivo* e *in vitro*, além de boa repetibilidade, indicando que ambos os sistemas *in vitro* podem substituir a soroneutralização em camundongos.

Apesar do teste de ELISA permitir confiabilidade no material isolado, as opções para identificação dos subtipos das toxinas ainda são limitadas. Por exemplo, até pouco tempo não havia um teste de ELISA específico para detectar a toxina beta-2 (BAUMS et al., 2004).

O cultivo celular para detecção da toxina pode ser uma opção de diagnóstico, no entanto, somente a MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) e G-402 (*Caucasian renal leiomyoblastoma*) são sensíveis na investigação da toxina (PAYNE et al., 1994; UZAL et al., 1994; BEAL et al., 2003). Além disso, o cultivo celular pode ser uma alternativa para substituir testes de soroneutralização atualmente utilizados para avaliar a potência de vacinas clostridiais. Borrmann et al. (2006) mensuraram, pela técnica de cultivo celular, o título de anticorpos contra toxina épsilon de coelhos vacinados e, comparando com as recomendações da *European Pharmacopeia* encontraram coeficiente de correlação significativo com as técnicas de mensuração *in vivo* por ela indicada, necessitando porém de mais estudos para validação de tal teste.

Uzal et al. (2003) compararam quatro técnicas para a detecção da toxina épsilon do *C. perfringens* tipo D no conteúdo intestinal e outros fluídos corpóreos de ovinos e caprinos e concluíram que o diagnóstico da enterotoxemia não pode ser baseado somente na detecção da toxina épsilon, mas também associado em achados clínicos e patológicos.

Frente à diversas técnicas laboratoriais atualmente disponíveis para pesquisa, a técnica de ELISA apresenta vantagens como a completa abolição dos testes de soroneutralização, redução do tempo de realização e leitura do teste, baixo custo e a não exposição de pessoas a agentes potencialmente infecciosos.

2.4. Enterotoxemia – prevenção

Independente da enfermidade e da espécie animal acometida, a prevenção é sempre o processo mais econômico quando comparada aos prejuízos decorrentes de tratamentos e de controle da enfermidade após seu estabelecimento e difusão em um rebanho.

A enterotoxemia causada pela ação da toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D leva a perdas consideráveis no rebanho ovino, uma vez que o tratamento na grande maioria dos casos é impraticável. Devido às características ecológicas do agente, que é ubiqüitário do trato digestivo dos animais e do solo, e pela forma de resistência na natureza por meio de esporos, a erradicação da enfermidade é praticamente impossível.

A prevenção da doença é direcionada para evitar a proliferação rápida do microrganismo no trato intestinal e neutralização da toxina conseqüentemente produzida. Dessa forma, medidas de profilaxia são fundamentais no controle da enterotoxemia, sendo que duas medidas devem ser ressaltadas como de grande importância: o manejo alimentar adequado (RADOSTITS et al, 2000) e principalmente a vacinação dos animais (JANSEN, 1967; SMITH; SHERMAN, 1994; UZAL; KELLY, 1999; PUGH, 2002; EHRETH, 2003).

No entanto, inúmeros fatores estão associados às falhas de imunidade após a vacinação de um rebanho, seja por fatores oriundos do antígeno ou

decorrentes da elaboração, conservação e utilização da vacina (McCLUGGAGE, 2000), ou ainda decorrentes do animal, como a incapacidade de formação de anticorpos vacinais no caso de alguns animais jovens (TIZARD, 1992; LEITE, 1996).

2.4.1 Papel da imunização passiva

A proteção transferida da mãe para o filho, seja via placentária, colostro ou ambos, é chamada passiva. Esse mecanismo é essencial para sobrevivência e higidez dos recém-nascidos que ainda não possuem um sistema imunológico totalmente desenvolvido (BRAMBELL, 1958; JEFFCOTT, 1972).

Em ruminantes, a complexidade da placenta do tipo sindesmocorial, constituída de cinco camadas de tecidos, determina a transferência de imunidade passiva pós-natal, sendo a ingestão de colostro essencial para a aquisição de anticorpos maternos e sobrevivência do neonato (BRAMBELL, 1958; JEFFCOTT, 1972; CAMPEL; SIEGEL, 1977). O aumento na concentração de imunoglobulinas dos cordeiros só ocorre quando o animal ingere colostro nas primeiras horas de vida (O'DOHERTY; CROSBY, 1997).

Em ovinos, assim como nos demais ruminantes, a absorção das imunoglobulinas ocorre entre 24 e 36 horas de vida (HOUGH et al., 1990). Neste período, o trato gastrointestinal imaturo dos cordeiros permite que anticorpos produzidos e secretados ativamente no colostro cheguem intactos ao intestino delgado e, em seguida, ao sistema circulatório (BRAMBELL, 1958; JEFFCOTT, 1972; O'DOHERTY; CROSBY, 1997).

As imunoglobulinas séricas adquiridas via colostro nos ruminantes alcançam um pico de concentração entre 24 e 48 horas de vida. Após esse período, a concentração de anticorpos decresce, resultado do catabolismo dessas macromoléculas e gradativamente inicia-se a síntese endógena de imunoglobulinas (McCOY, 1970; KRUSE, 1983; MACHADO NETO; PACKER, 1986; PAULETTI et al., 2002).

Falhas na absorção de anticorpos em cordeiros, caracterizada como falha na transferência na imunidade passiva (FTIP), tornam os recém-nascidos

suscetíveis às doenças, como septicemia neonatal, pneumonia e diarreia entre outras afecções, elevando significativamente a taxa de mortalidade de cordeiros recém-nascidos e acima de tudo, comprometendo também o desempenho produtivo em idades superiores (NOCEK et al., 1984; DONOVAN et al., 1998; MACHADO NETO et al., 2004; La RAGIONE et al., 2006).

Algumas características afetam a quantidade de imunoglobulinas transferidas aos recém-nascidos e entre elas estão os partos gemelares ou triplos (HALLIDAY, 1974), o vigor do neonato de mamar, tempo de gestação, tempo decorrido do nascimento até a primeira ingestão de colostro e a concentração de imunoglobulinas no mesmo (HALLIDAY, 1978; CABELLO; LEVIEUX, 1981; GILBERT et al., 1988; MACHADO NETO et al., 1997; MORIN; McCOY, 1997).

A formação de um banco de colostro bovino constitui-se em uma importante prática de manejo em operações comerciais, assegurando o fornecimento de quantidade adequada de imunoglobulinas aos cordeiros recém-nascidos, pois a homologia da fonte heteróloga permite o processo de aquisição de imunidade, além de evitar a transmissão de patógenos via colostro materno (LOGAN et al., 1978; HOUWERS et al., 1983). No entanto, Veschi et al. (2006) não identificaram níveis de títulos protetores contra a enterotoxemia no soro de caprinos recém nascidos após a ingestão de colostro de vacas previamente imunizadas com vacina contra a enterotoxemia e outras clostridioses.

De la Rosa et al. (1997) encontraram uma concentração de anticorpos anti-toxina épsilon em cordeiros não-vacinados considerada protetora, sendo que tais cordeiros eram filhos de ovelhas vacinadas cerca de 30 dias antes da parição. Troxel et al. (1997) reportaram resposta similar em bezerros filhos de vacas vacinadas 124 dias antes da parição. Araújo et al. (2009) mensuraram os valores de anticorpos colostrais em bezerros contra o *Clostridium chauvoei*, empregando-se duas vacinas clostridiais comerciais polivalentes. Vacinaram as mães dois meses antes da parição com reforço 42 dias após e os bezerros foram monitorados sorologicamente aos 7, 45 e 90 dias. A resposta sorológica passiva dos bezerros foi semelhante até os três meses de idade. Roussel;

Herdje, (1990) observaram que, quando o rebanho bovino é sistematicamente vacinado, os anticorpos colostrais protegem os bezerros por até 3-4 meses após o nascimento, devendo então a primovacinação ser realizada após este período.

2.4.2 Papel da imunização ativa

A imunidade ativa, adquirida de forma artificial, a partir da vacinação, induz a um período prolongado de proteção, sendo mais intensa, rápida e duradoura a partir das revacinações (*booster*) (TIZARD, 2002).

A exposição natural de pequenos ruminantes à toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D pode não estimular, de maneira geral, a formação de títulos séricos de antitoxina épsilon com magnitude suficiente para promover a proteção quando a enterotoxemia é desencadeada (GRINER, 1961). Blackwell et al. (1983) evidenciaram que em rebanhos ovinos não vacinados, até 54% dos animais apresentaram títulos séricos de antitoxina épsilon.

Nesse sentido, o controle efetivo da enfermidade não pode ser realizado sem a utilização de medidas imunoproláticas (JANSEN, 1967).

Níveis séricos de 0,2 UI de antitoxina épsilon/ml conferem proteção contra a enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D experimentalmente induzida em ovinos (JANSEN, 1960; FREICHS; GRAY, 1975; BLACKWELL et al., 1991), enquanto que em caprinos o nível sérico mínimo de antitoxina/ml é de 0,25 UI (UZAL et al., 1998).

No país, tem ocorrido um incremento na produção de vacinas indicadas para clostridioses. As normas para controle dessas vacinas são definidas na legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2007). Em relação ao *C. perfringens* tipo D é exigido que se encontre, por meio da técnica de soroneutralização em camundongo, valores iguais ou superiores a 0,5 UI/ml antitoxina épsilon (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005).

Blackwell et al. (1991) e Rogers; Swecker (1997) relataram que a qualidade das vacinas é extremamente variável entre países e entre os laboratórios produtores, e nem sempre as vacinas são corretamente armazenadas, transportadas e administradas. Diversos estudos realizados no mundo sobre a eficiência de toxóides clostridiais demonstraram a baixa antigenicidade dos produtos testados.

No Brasil, Lobato et al. (1998) ao avaliarem a eficiência de toxóides botulínicos dos tipos C e D comercializados no País, verificaram que nenhum produto foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes específicos suficientes para atender os requisitos mínimos exigidos no teste de potência. Azevedo et al. (1998) testaram a potência de seis vacinas clostridiais polivalentes que continham em sua composição toxóides contra *C. perfringens* tipos C e D, e demonstraram um baixo poder imunogênico dos produtos nacionais disponíveis no mercado. Em 2000, Lobato et al. avaliaram seis vacinas comerciais contra *C. perfringens* tipos C e D e um toxóide bivalente padrão, constataram que somente duas vacinas comerciais e o toxóide padrão atenderam os requisitos exigidos pelo teste de potência em coelhos e induziram produção de anticorpos neutralizantes nos bovinos vacinados. Balsamão et al. (2000), ao avaliarem 11 vacinas clostrídicas polivalentes comerciais e uma bacterina-toxóide padrão contra *C. sordellii*, verificaram que apenas o padrão e mais três vacinas comerciais atenderam os requisitos do teste de potência. Veschi et al. (2005) avaliaram a resposta sorológica de seis vacinas comerciais contra a enterotoxemia causada pela ação da toxina épsilon em caprinos. A porcentagem de animais considerados protegidos variou, sendo que uma das vacinas comerciais não protegeu nenhum dos caprinos e as demais protegeram de 40 a 66% dos animais.

Ovinos são protegidos contra a enterotoxemia quando vacinas de alto poder imunogênico e adequados protocolos de vacinação são utilizados (JANSEN, 1960) e permanecem protegidos por longo período quando administra-se dose de reforço, de 28 a 42 dias após a primovacinação (UZAL et al., 1998).

Veschi et al. (2006) avaliaram a resposta imune de caprinos que receberam uma ou duas doses de vacina contra a enterotoxemia e demonstraram a importância da dose de reforço no aumento e na manutenção do nível de anticorpos antitoxina épsilon.

Ovinos e bovinos foram utilizados por Kennedy et al. (1997) para avaliar a resposta de vacina combinada de *C. perfringens* tipos C e D. Um aumento no título de anticorpos foi observado duas semanas após a administração da segunda dose, realizada duas semanas após a primovacinação, confirmando assim os relatos de que os antígenos clostridiais podem induzir a proteção de anticorpos em quantidades superiores quando se utilizam duas doses iniciais com intervalos de duas a seis semanas entre elas.

Kerry e Graig (1979) avaliaram sorologicamente duas vacinas comerciais em condições de campo e observaram diferenças na resposta imune dos ovinos, na dependência do esquema de imunização utilizado. A vacina formulada com oito componentes, e recomendada pelo fabricante na dose de 5,0 ml para a primovacinação e 2,0 ml para a dose de reforço, apresentou resultados superiores aos da vacina contendo sete antígenos e indicada numa única dose.

Para Uzal et al. (1997), está evidente a necessidade de outras pesquisas para o desenvolvimento de vacinas de poder imunogênico satisfatório, bem como de estratégias de imunoprofilaxia adequadas para o controle da enfermidade, principalmente nos ovinos, em que perdas ocorrem devido a vacinas ineficientes e protocolos de imunização incorretos.

3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMSON, R.H.; LY, J.C.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.; OCHI, S.; SAKURAI, J.; UZAL, F.; CURRY, F.E. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. **Infect. Immun.**, v.73, p.4879-4887, 2005.
- ALBINI, S.; BRODARD, I.; JAUSSE, A.; WOLLSCHLAEGER, N.; FREY, J.; MISEREZ, R.; ABRIL, C. Real-time multiplex for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. **Vet. Microbiol.**, v.127, p.179-185, 2008.
- ARAÚJO, R.F.; CURCI, V.C.L.M.; NÓBREGA, F.L.C.; FERREIRA, R.M.M.; DUTRA, I.S. Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, p. 00-00, 2010.
- ASUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and JohnWiley and Sons, 1994.
- AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L. MAIA, J. D.; NASCIMENTO, R. A.P. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.50, p.239-242, 1998.
- BANCHERO, G.E.; QUINTANS, G.; MARTIN, G.B.; MILTON, J.T.B.; LINSLEY, D.R. Nutrition and colostrum production in sheep. 2. Metabolic and hormonal responses to different energy sources in the final stage of pregnancy. **Reprod. Fertil Dev.**, v.16, p.645-653, 2004.
- BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Vet. Microbiol.**, v.100, p.11-16, 2004.
- BEAL, D.R.; TITBALL, R.W.; LINSLEY, C.D. The development of tolerance to *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in MDCK and G-402 cells. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.22, p.593-605, 2003.
- BEKELE, T.; OTESILE, E.B.; KASALI, O.B. Influence of passively acquired colostral immunity on neonatal lamb mortality in Ethiopian highland sheep. **Small Rumin. Res.**, v.9, p. 209-215, 1992.
- BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G. Clinical signs, treatment, and postmortem lesions in dairy goats with enterotoxaemia: 13 cases (1979 – 1982). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.200, p.214-217, 1992.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
 BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G.; PRESCOTT, J.; WILCOX, B. Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.1147-1152, 1991.

BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G.; BELL, J. A. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids. **Can. J. Comp. Med.**, v.47, p.127-132, 1983.

BOARER, C.D.; SOJKA, M.G.; WHITE, V.J.; ROEDER, P.L. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **J. Biol. Stand.**, v.16, p.207-218, 1988.

BOLAND, T.M.; BROPHY, P.O.; CALLAN, J.J.; QUIN, P.J.; NOWAKWISKI, P.; CROSBY, T.F. The effects of mineral supplementation to ewe in late pregnancy on colostrums yield and immunoglobulin G absorption in their lambs. **Livest. Prod. Sci.**, v.97, p.141-150, 2005.

BOARER, C.D.H.; SOJKA, M.G.; WHITE, V.J.; ROEDER, P.L. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **J. Biol. Stand.**, v.16, p.207-218, 1988.

BORRMAN, E.; SHCULZE, F.; CUSSLER, K.; HÄNEL, I.; DILLER, R. Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novyi* alpha toxin. **Vet. Microbiol.**, v.114, p.41-50. 2006.

BRITISH PHARMACOPEIA. **Veterinary antisera and veterinary vaccines**. London: Department of Health and Social Security, Medicines Commission, 2005.

BULLEN, T.O.; NERVIG, R.M.; PEMBERTON, J.R. Metallic salts as adjuvants for veterinary biologics, In: KADIS, S.; MONTIE, T.C.; AJL, S.J. (Eds.). **Microbial toxins**. New York: Academia Press, v.2A., 1970.

BUXTON, D.; LINKLATER, K.A.; DYSON, D.A. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. **Vet. Rec.**, v.102, p.241-245, 1978.

BUXTON, D.; MORGAN, K.T. Studies of lesions produced in the brains of colostrums deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type D toxin. **J. Comp. Pathol.**, v.86, p.435-447, 1976.

BRAMBEL, J.W.R. The passive immunity of the young mammal. **Biol. Rev.**, v.33, p.488-531, 1958.

CABELLO, G.; LEVEIEUX, D. Absorption of colostral IgG1 by the newborn lamb: influence of the length of gestation, birth weight and thyroid function. **Res. Vet. Sci.**, v.31, p.190-194, 1981.

CAMPBELL, S.G.; SIEGEL, M.J.; KNOWLTON, B.J. Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lambs. **New Zel. Vet. J.**, v.25, p.361-367, 1977.

COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; SCHMITZ, M.; GERMER, M.; NASCIMENTO, R.A.P.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.; UZAL, F.A. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v.23, p.173-178, 2003.

DAMASSA, A.J.; BROOKS, D.L.; ADLER, H.E. Caprine mycoplasmosis : wide spread in goat with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (large colon type). **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.322-325, 1983.

De La ROSA, C.; HOUGUE, D. E.; THONNEY, M. L. Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.2328-2334, 1997.

DONOVAN, G.A.; DOHOO, I.R.; MONTGOMERY, D.M.; BENNETT, F.L. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Prevent. Vet. Med.**, v.34, p.31-46, 1998.

EBERT, E.; ÖPPELING, V.; WERNER, E.; CUSSLER, K. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxoid containing veterinary vaccines. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.24, p.299-311, 1999.

EHRETH, J. The value of vaccination: a global perspective. **Vaccine**, v.21, p.4105-4117, 2003.

EL IDRISSE, A.H.; WARD, G.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. **Vet. Microbiol.**, v.31, p. 386-389, 1992.

FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E.; SAYEED, S.; FISHER, D.J.; POON, R.; ADMANS, V.; ROOD, J.I.; McCLANE, B.A.; SAPUTO, J.; UZAL, F.A.; Development and Application of an Oral Challenge Mouse Model for Studying *Clostridium perfringens* Type D Infection. **Infect. Immun.**, v.75, p.4282-4288, 2007.

FERNANDEZ MIYAKAWA, M.E.; UZAL, F.A. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 27, p.231-241, 2003.

FERNANDEZ MIYAKAWA, M.E.; IBARRA, C.A.; UZAL, F.A. In vitro effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on water and ion transport in ovine and caprine intestine. **Anaerobe**, v.9, p.144-149, 2000.

FERRAREZI, M.C.; CARDOSO, T.C.; DUTRA, I.S. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. **Anaerobe**, v.14, p.328-331, 2008.

FINNIE, J.W. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review. **Aust. Vet. J.**, v.81, p.219-221, 2003.

FINNIE, J.W.; BLUMBERGS, P.C.; MANAVIS, J. Neuronal damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **J. Comp. Pathol.**, v.120, p.415-420, 1999.

FLEMMING, S. Enterotoxemia in neonatal calves. **Food Anim. Pract.**, v.1, p.509-514, 1985.

FREICHS, G.N.; GRAY, A.K. The relation between the rabbit potency test and response of sheep to sheep clostridia vaccines. **Res. Vet. Sci.**, v.18, p.70-75, 1975.

GARMORY, H.S.; CHANTER, N.; FRENCH, N.P.; BUESCHEL, D.; SONGER, J.G.; TITBALL, V.R.W. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. **Epidemiol. Infect.**, v. 124, p.61-67, 2000.

GILBERT, R.P.; GASKINS, C.T.; HILLER, J.K.; PARKER, C.F.; McGUIRE, T.C. Genetic and enviromental factors affecting immunoglobulin G1 concentrations in ewe colostrum and lamb serum. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.855-863, 1988.

GIRÃO, R.N.; MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, E.S. Mortalidade de cordeiros da raça Santa Inês em núcleo de melhoramento do Estado do Piauí. **Ciênc. Rural**, v.28, p.641-645, 1998.

GRECO, G.; MADIO, A.; BUONAVOGLIA, D.; TOTARO, M.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. **Vet. J.**, v.170, p.346-350, 2005.

GRINER, L.A. Enterotoxaemia of sheep. III. *Clostridium perfringens* type D antitoxin titres of normal, novaccinated lambs. **Am. J. Vet. Res.**, v.22, p.447-448, 1961.

GRINER, L.A.; AICHELMAN, W.W.; BROWN, G.D. *Clostridium perfringens* type D (epsilon) enterotoxemia in Brown Swiss dairy calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.129, p.375-376, 1956.

HALLIDAY, R. Immunoglobulins concentrations in Scottish Blackface lambs on a hill farm. **Res. Vet. Sci.**, v.24, p.264-266, 1978.

HALLIDAY, R. Variations in immunoglobulin concentration in Merino and Scottish blackface lambs. **Anim. Product.**, v.19, p.301-308, 1974.

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. Evalution of a reserved passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxin. **J. Food Prot.**, v.49, p.523-525, 1986.

HATHEWAY, C.L. Toxigenic Clostridia. **Clin. Microbiol.**, v.3. p.66-98, 1990.

HAUSCHILD, A.H.W.; KADIS, S.; MONTIE, T.C. AJL, S.J. **Microbial toxins**. vol. II A. New York: Academic Press, 1971. 193p.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLETI, J.; FREY, J.; POPPOF, M.; GILBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.358-361, 1999.

HOEFLING, D. C. Recognizing diarrhea caused by *Clostridium perfringens* type C. **Vet. Med.**, v.84 p.437-440, 1989.

HOWERS, D.J.; KÖNIG, C.D.W.; BER, G.F.; SCHAAKE, J. Maedi-visna control in sheep I. Artificial rearing of colostrums-deprived lambs. **Vet. Microbiol.**, v.8, p.179-185, 1983.

HUNTER, S.E.C. Cloning and nucleotide sequencing of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.60, p.102-110, 1992.

ITODO, A.E.; ADESIVUN, A.A.; ADEKEVE, J.O.; UMOH, J.U. Toxintypes of *Clostridium perfringens* strains isolated from sheep, cattle and paddock soils in Nigeria. **Vet. Microbiol.**, v.12, p.93-96, 1986.

JANSEN, B.C. The duration of immunity of pulpy kidney disease of sheep. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, v.34, p.333-334, 1967.

JANSEN, B.C. The experimental reproduction of pulpy kidney disease. **J. South. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v.31, p.205-208, 1960.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biol. Rev.**, v.47, p.439-464, 1972.

JUNEJA, V.K.; NOVAK, J.S.; HUANG, L.; EBLEN, B.S. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. **Food Control**, v.14, p.163-168, 2003.

JUNQUEIRA, J.O.B.; MORO, E.; BARBARINI, J.O.; MATSUMOTO, T.; FADIL, P.; UMEHARA, O. Reações vacinais em bovinos: reações nos locais de aplicação de vacinas contra clostridioses. **Hora Vet.**, ano 19, p.23-28, 2000.

KADRA, B.; GUILLOU, J.P.; POPOFF, M.; BOURLIOUX, P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.24, p.259-266, 1999.

KENNEDY, K.K.; NORRIS, S.J.; BECKENHAUER, W.H.; WHITE, R.G. Vaccination of cattle and sheep with a combined *Clostridium perfringens* types C and D toxoid. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p.1515-1517, 1997.

KERRY, J. B.; GRAIG, G. R. field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. **Vet. Rec.**, v. 105, p. 551-554, 1979.

KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W.; HUNTER, P. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia. In: COETZER J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN R.C (Eds.). **Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. v.2. Oxford: Oxford University Press, 1994. p.1314-1322.

KRUSE, P.E. The importance of colostrum immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Ann. Rech. Vet.**, v.14, p.349-353, 1983.

La RAGIONE, R.M.; BEST, A.; CLIFFORD, D.; WEYER, U.; JOHNSON, J.; MARSHALL, R.N.; MARSHALL, J.; COOLEY, W.A.; FARRELLY, S.; PEARSON, G.R.; WOODWARD, M.J. Influence of colostrum deprivation and concurrent *Cryptosporidium parvum* infection on the colonization and persistence of *Escherichia coli* O157 :H7 in young lambs. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.819-828, 2006.

LEITE, R.C. Diarréia bovina à vírus. In: I SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1996, Guarulhos. **Anais...** Guarulhos, 1996. p.19-20.

LEWIS, C.J. Clostridial disease. In: MARTIN, W.B.; AITKEN, I.D. (Eds.). **Diseases of sheep**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. p.131-143.

LOBATO, F.; ASSIS, R.A. Clostridioses dos animais. In: II MINAS GERAIS BUIACTRICS SYMPOSIUM, 2., 2005, Minas Gerais. Minas Gerais: Associação de Buiatria de Minas Gerais, 2005.

LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R.A.; MARTINS, N.E.; GONÇALVES, L.C.B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, p.313-318, 2000.

LOBATO, F.C.F.; SILVA, N.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V.; MAIA, J.D. Potência de toxóides botulínicos bivalentes C e D produzidos e comercializados no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.20, p.35-38, 1998.

LOGAN, E.F.; FOSTER, W.H.; IRWIN, D. A note on bovine colostrums as an alternative source of immunoglobulin for lambs. **Anim. Product.**, v.26, p.93-96, 1978.

MACHADO NETO, R.; CASSOLI, L.D.; BESSI, R.; PAULETTI, P. Avaliação do fornecimento adicional de colostros para bezerros. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.33, p.420-425, 2004.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U.; BONILHA, L.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZZOCK, A.G.; CÂNDIDO, J.G. Concentração de IgG sérica em bezerros da raça Neore, Guzerá, Gir e Caracu: 2 Efeitos sobre o crescimento e mortalidade até a desmama. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.26, p.920-923, 1997.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U. Flutuação de imunoglobulina sérica em bezerros da raça holandesa submetidos a diferentes regimes de aleitamento. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.15, p.439-447, 1986.

MAHONY, D.E.; GILLIATT, E.; DAWSON, S.; STOCKDALE, E.; LEE, S.H.S. Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.2141-2143. 1989.

MANTIS, N.J. Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57 p.1424-1439, 2005.

MAYER, B.; ZOLNAI, A.; FRENYÓ, L.V.; JANCSIK, V.; SZENTIRMAY, Z.; HAMMARSTRÖM, L.; KACSKOVICS, I. Localization of the sheep FcRn in mammary gland. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.87, p.327-300, 2002.

McCLANE, B.A.; ROOD, J.I.; SONGER, J.G.; TITBALL, R.W. **The clostridia:** molecular biology and pathogenesis. Great Britain: Academic Press, 2004. 548p.

McCLUGGAGE, D.M. Vaccinations in veterinary medicine. A new perspective. **J. Am. Hol. Vet. Med. Assoc.**, v.14. n.2, p.7, 2000. Disponível em: members.aol.com/ifta2/vaccine1.html. Acesso em: 10 jul. 2003.

McCOY, G.C.; RENEAU, J.K.; HUNTER, A.G.; WILLIAMS, J.B.; Effects of diet and time on blood serum proteins in the newborn calf. **J. Dairy Sci.**, v.53, p.358-362, 1970.

McDONEL, J.L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmacol. Ther.**, v.10, p.617-655, 1980.

MEER, R.R.; SONGER, J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. **Am. J. Vet. Res.**, v.58, p.702-705, 1997.

MIHELEC, V.A.; DUNCAN, C.L.; CHAMBLISS, G.H. Characterization of a Bacteriocinogenic Plasmid in *Clostridium perfringens* CW55. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.14. p.771-779, 1978.

MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; MATSUSHITA, O.; MATSUSHITA, C.; OKABE, A. Lambda toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon toxin by releasing its N-and C-terminal peptides. **Microbiol. Immunol.**, v.41, p.527-535, 1997.

MIYAMOTO, O.; SUMITANI, K.; NAKAMURA, T.; YAMAGAMI, S.; MIYATA, S.; ITANO, T.; OKABE, A. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.189, p. 109-113, 2000.

MIYATA, S.; MINAMI, J.; TAMAI, E.; MATSUSHITA, O.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.39463-39468, 2002.

MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p.13778-13783, 2001.

MORGAN, K.T.; KELLY, B.G.; BUXTON, D. Ultrastructural study of brain lesions produced in mice by the administration of *Clostridium welchii* type D toxin. **J. Comp. Pathol.**, v.85, p.461-466, 1975.

MORIN, D.E.; McCOY, G.C.; HURLEY, W.L. Effects of quality, quantity and timing of colostrums feeding and addition of a dried colostrums supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.747-753, 1997.

NAGAHAMA, M.; LIDA, M.; SAKURAI, J. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on rat isolated aorta. **Microbiol. Immunol.**, v.37, p.447-450, 1993.

NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. **Toxicon**, v.29, p.211-217, 1991.

NAYLOR, R.D.; MARTIN, P.K.; SHARPE, R.T. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. **Res. Vet. Sci.**, v. 42, p. 255-256, 1987.

NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. **Can. Vet. J.**, v.21, p.141-148, 1980.

NILO, L. Enterotoxemia *Clostridium perfringens*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C. O. (Eds.). **Pathology of bacteriology infection in animal**. Ames: Iowa State University Press, 1986. p.206-214.

NOBREGA, J.E.; RIET-CORRÊA, F.; NÓBREGA, R.S.; MEDEIROS, J.M.; VASCONCELOS, J.S.; SIMÕES, S.V.D.; TABOSA, I.M. Mortalidade de cordeiros no semi-árido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v.25, p. 171-178, 2005.

NOCEK, J.E.; BRAUND, D.G.; WARNER, R.G. Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin and continued feeding of colostrums on calf grain, health and serum protein. **J. Dairy Sci.**, v.67, p.319-333, 1984.

ODENDAAL, M.W. *Clostridium perfringens* group. In:_____. **Infections diseases of livestock with: special reference to Southern Africa**. Oxford: Oxford University Press, v.2, 1994. p.1290-1298.

O'DOHERTY, J.V.; CROSBY, T.F. The effect of diet in late pregnancy on colostrum production and immunoglobulin absorption in sheep. **J. Anim. Sci.**, v.64, p.87-96, 1997.

OXER, D.T. Enterotoxaemia in goats. **Aust. Vet. J.**, v. 32, p.62-66, 1956.

ÖZTÜRK, G. Etiopathology of enterotoxaemia in small ruminants in Elazığ and surrounding cities. Turk. **J. Vet. Anim. Sci.**, v.20, p.63-68, 1996.

ÖZCAN, C.; GÜRÇAY, M. Enterotoxaemia incidence in small ruminants in Elazığ and surrounding provinces in 1994-1998. Turk. **J. Vet. Anim. Sci.**, v.24, p.283-286, 2000.

PARREIRAS, P.M.; LOBATO, F.C.F.; HENEINE, F.L.G.D.; ASSIS, R.A.; BALSAMÃO, G.M.; NASCIMENTO, R.A.P. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.328-330, 2002.

PAULETTI, P.; MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U.; BESSI, R. Avaliação de níveis séricos de imunoglobulina, proteína e desempenho de bezerras da raça holandesa. **Pesqui. Agropec. Bras.**, v.37, p.89-94, 2002.

PAYNE, D.; OYSTON, E. The *Clostridium perfringens* e-toxin. In:_____. **The clostridia: molecular biology and pathogenesis**. London: Academic Press, 1997. p.439-447.

PAYNE, D.W.; WILLIAMSON, E.D.; HVAR, H.; MODI, N. BROWN, J. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.116, p.161-167, 1994.

PERCIVAL, D.A.; SHUTTLEWORTH, A.D.; WILLIAMSON, E.D.; KELLY, D.C. Anti-idiotypic antibody-induced protection against *Clostridium perfringens* type D. **Infect. Immun.**, v.58, p.2487-2492, 1990.

PREZIUSO, S.; RENZONI, G.; ALLEN, T.E.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; DERMARTINI, J.C.; BRACA, G. Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. **Vet. Microbiol.**, v.104, p.157-164, 2004.

PUGH, D.G. Causes of Diarrhea in Older Lambs and Kids. In: _____. **Sheep and goat medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002. p.84-88.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clostridium* species. In: _____. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1992. p. 191-208.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine: textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**, 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 1877p.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27, p.493-497, 1938.

ROGERS, G.M.; SWECKER, W.S. Clostridial vaccines: timing and quality assurance. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.19, p.278-285, 1997.

ROOD, J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens* **Ann. Rev. Microbiol.**, v.50, p. 333-360, 1998.

ROSSKOPF-STREICHER, U.; VOLKERS, P.; NOESKE, K.; WERNER, E. Quality assurance of *Clostridium perfringens* toxoid vaccines – ELISA versus mouse neutralization test. **Altex**, v.21, p.65-69, 2004.

SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; FUJII, Y. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. **Infect. Immun.**, v.42, p.1183-1186, 1983.

SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; OCHI, S. Major toxins of *Clostridium perfringens*. **J. Toxicol.**, v.16, p.195-214, 1997.

SEBALD, M.; PETIT, J.C. **Laboratory methods anaerobic bacteria and their identification**. 2.ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p.189-197

SEIFERT, H.; BÖHNEL, H. Clostridiosen. In: _____. **HANBUCH der bakteriellen infektionen bei Tieren**. Band II / 4. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1994, p.1-222.

SHANKS, P.L. Enterotoxaemia in goats. **Vet. Rec.**, v.61, p.262-264, 1949.

SMEDLEY, J. G.; FISHER, D. J.; SAYEED, S.; CHAKRABARTI, G.; McCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.152, p.183-204, 2004.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Enterotoxemia. In: SMITH M.C.; SHERMAN D.M. (Eds.). **Goat medicine**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994. p.289-305.

SMITH, L.D.S. Virulence Factors of *Clostridium perfringens*. **Rev. Infect. Dis.**, v.1, p.254-260, 1979.

SOJKA, M.G.; WHITE, V.J.; THORNS, C.J.; ROEDER, P.L. The detection of *Clostridium perfringens* epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody based competition ELISA. **J. Biol. Stand.**, v.17, p.117-124, 1989.

SONGER, J.G. Clostridial diseases of small ruminants. **Vet. Res.**, v.29, p.219-232, 1998.

SONGER, J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p.216-234, 1996.

STERNE, M.; WARRACK, G. H. The types of *Clostridium perfringens*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 88, p.279-283, 1964.

SUHAIL, S.M.; DAUR, U.A.; SYED, M.; AHMED, N.; IJAZ, A. Prevalence of major livestock diseases in north Warziristian agency (Pakistan) **Sahard J. Agric.**, v.19, p.423-428, 2003.

TIZZARD. **Tizzard's veterinary immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v.1, 1992.

TROXEL, T.R.; BURKE, G.L.; WALLACE, W.T.; KEATON, L.W.; McPEAKE S. R.; SMITH, D.; NICHOLSON, I. Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. **J. Anim. Sci.**, v.75. p.19-25, 1997.

UNANUE, R.; BENACERRAF, B. **Textbook of immunology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R.; MORRIS, W.E.; BERMUDEZ, J.; BAISÓN, M. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.16, p.403-411, 2004.

UZAL, F.A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **Anaerobe**, v.10, p.135-143, 2004.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R.; THOMAS, R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.15, p. 94-99, 2003.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Serum antibody responses to a *Clostridium perfringens* epsilon toxóide vaccine in goats. **Anaerobe**, v.5, p.287-289, 1999.

UZAL, F.A.; BODERO, D.A.; KELLY, W R.; NIELSEN, K. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. **Vet. Rec.**, v.143, p.472-474, 1998.

UZAL, F.A.; GLASTONBURY, J.R.W.; KELLY, W.R.; THOMAS, R. Caprine enterotoxaemia associate with cerebral microangiopathy. **Vet. Rec.**, v.141, p.224-226, 1997a.

UZAL, F. A.; KELLY, W.R.; NIELSEN, K. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.51 p.223-231, 1997b.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Enterotoxaemia in goats: a review. **Vet. Res. Commun.**, v.20, p.481-492, 1996.

UZAL, F.A.; PASINI, M.I.; OLAECHEA, F.V.; ROBLES, C.A.; ELIZONDO, A. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. **Vet. Rec.**, v.135, p.279-280, 1994.

VAIKOSEN, E.S.; IKHATUA, U.J. Detection of high level of enterotoxin of *Clostridium perfringens* types C and D in small ruminants in Nigeria. **Small Rum. Res.**, v. 58, p. 287-290, 2005.

VESCHI, J.L.A.; DUTRA, I.S.; MIYAKAWA, M.E.F.; PERRI, S.H.V.; UZAL, F. A. Immunoprophylactic strategies against enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p. 51-54, 2006a.

VESCHI, J.L.A. **Eficácia de vacina experimental contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos**. 2006. 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006b.

VESCHI, J.L.A.; MIYAKAWA, M.F.; DUTRA, I.S.; ALVES, M.A.B.; BERMUDEZ, J.; UZAL, F.A. Avaliação sorológica de vacinas contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon em caprinos. In: VIII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA. 8., 2005, Búzios. **Anais...Búzios: COMBRAVET**, 2005.

WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; HUGUES, J.M.; DUNCANSON, P.; TERRY, R.S.; SMITH, J.E.; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. **Parasitology**, v.130, p.301-307, 2005.

CAPÍTULO II

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE CORDEIROS
SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE PRIMOVACINAÇÃO
CONTRA ENTEROTOXEMIA**

RESUMO

Objetivou-se avaliar quatro protocolos distintos de primovacinação em cordeiros contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D. Vinte e quatro cordeiros, filhos de ovelhas prenhes vacinadas no último mês de gestação, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o protocolo de primovacinação adotado. Para comparação entre os protocolos, segundo o momento de avaliação, foi realizada análise de variância não-paramétrica complementada pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Trinta dias após o reforço vacinal a mediana da resposta sorológica conferida pelos protocolos de primovacinação aos 7 dias de idade (0,324), diferiu-se significativamente ($p < 0,05$) dos demais protocolos de primovacinação aos 15 dias de idade (0,739), 30 dias de idade (0,652) e 45 dias de idade (0,662). Concluiu-se que, nas condições do presente estudo, a antecipação da primovacinação nos cordeiros não comprometeu a imunidade protetora conferida pela vacina, ou seja, em todos os quatro protocolos avaliados o título mínimo protetor de 0,2 UI/ml foi alcançado e mantido.

Palavras-chave: enterotoxemia, cordeiros, protocolos, vacinação

ABSTRACT

The objective was to evaluate four different protocols for primary vaccination in lambs against enterotoxemia caused by epsilon toxin of Clostridium perfringens type D. Twenty-four lambs, sons of pregnant ewes vaccinated in the last month of gestation, were randomly divided into four groups according to the primary vaccination protocol adopted. For comparison between the protocols, according to the time of evaluation, analysis of variance was performed nonparametric test complemented by the Dunn multiple comparison. Thirty days after the booster vaccination the median antibody response conferred by primary vaccination protocols to 7 days of age (0.324), differed significantly ($p < 0.05$) from other protocols for primary vaccination at 15 days of age (0.739) 30 days of age (0.652) and 45 days of age (0.662). It was concluded that under the conditions of this study, the anticipation of the first vaccination in the lambs did not compromise the protective immunity conferred by the vaccine, or in all four protocols evaluated the minimum protection titer of 0.2 IU / ml was achieved and maintained.

Key-words: enterotoxemia, lambs, protocols, vaccination

1.0 INTRODUÇÃO

Enterotoxemia é a enfermidade que causa grave perdas econômicas nas criações de pequenos ruminantes (UZAL et al., 1997a).

O tratamento na grande maioria dos casos é impraticável, uma vez que o agente é ubiqüitário do trato digestivo dos animais e do solo, e pela forma de resistência na natureza por meio de esporos, a erradicação da enfermidade torna-se praticamente impossível (SONGER, 2010).

Desse modo, a vacinação é a principal medida profilática adotada para reduzir perdas ou minimizar a severidade da enterotoxemia nos ovinos (FERNANDEZ-MIYKAWA et al., 2003).

A imunidade para a toxina épsilon (ETX), produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D, nesses animais é conferida por anticorpos (BOARER et al., 1988; PERCIVAL et al., 1990), e a concentração sérica de 0,2 UI/ml de antitoxina épsilon tem sido reportada por ser protetora nos ovinos (BLACKWELL et al., 1991).

Embora no mercado veterinário possam ser encontradas diversas vacinas contra toxina épsilon, há uma escassez de estudos relacionados ao teste de eficácia de tais vacinas a campo e acima de tudo nas espécies alvo dessa importante clostridiose dos pequenos ruminantes.

Particularidades da espécie animal, os manejos nutricional, reprodutivo e sanitário adotado em cada propriedade entre outros fatores, são pontos-chave que os laboratórios produtores também deveriam levar em consideração no momento da indicação de protocolos de primovacinação.

Logo, para a imunização adequada dos animais contra enterotoxemia causada pela ETX é de fundamental importância conhecer a amplitude e duração da resposta sorológica desencadeada pela vacinação frente às condições adversas em que as vacinas são administradas no campo.

2.0 OBJETIVO

Comparar a resposta sorológica (anticorpos antitoxina épsilon) de cordeiros induzida por vacina comercial contra enterotoxemia, desencadeada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D, em quatro protocolos distintos de primovacinação.

3.0 HIPÓTESE

A antecipação da primovacinação dos cordeiros contra enterotoxemia confere um título sérico considerado protetor.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento e origem dos animais

A vacinação e as colheitas das amostras sanguíneas dos animais foram realizadas em uma propriedade rural particular da região sul do estado de São Paulo, localizada no município de Itapetininga (latitude 23°35'30" sul e longitude 48°03'11" oeste).

A propriedade rural apresentava controle de escrituração zootécnica do rebanho, o que possibilitou a execução do experimento. Não houve alteração do manejo geral, reprodutivo e nutricional da propriedade.

As ovelhas prenhes escolhidas que compunham o lote do experimento eram das raças Texel, Ile de France e mestiças, sem histórico de vacinação contra enterotoxemia nos últimos 24 meses.

A utilização dos animais nesta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP (Botucatu) sob o protocolo nº 57/2008.

4.1.1 Vacina comercial

A escolha da vacina polivalente, contendo na sua formulação a antitoxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D, escolhida foi a mais utilizada pelos ovinocultores da região sul e centro-sul do Estado de São Paulo. Foi adquirida em um estabelecimento comercial de insumos agropecuários e, observou-se sistematicamente o prazo de validade e a temperatura de conservação da mesma.

Para manter o sigilo comercial e ético do laboratório produtor, a vacina utilizada foi identificada com a letra X. A sua composição assim como a concentração de antitoxina épsilon presente na sua formulação estão descritas no quadro 2.

Quadro 2: Composição da vacina polivalente contra clostridioses adquirida no mercado e utilizada no experimento.

Vacina	Composição	Concentração de antitoxina épsilon descrita pelo fabricante
X	<i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Clostridium septicum</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> B, C e D; <i>Clostridium novyi</i> ; <i>Clostridium sordellii</i> ; <i>Clostridium tetani</i> .	0,5 UI/ml

4.1.2 Protocolos vacinais e colheitas de amostras sangüíneas

Foi realizada uma triagem prévia no rebanho da propriedade rural para identificação de ovelhas prenhes (primíparas e/ou múltiparas) e híginas que se encontravam por volta do início do último mês de gestação. As ovelhas escolhidas tiveram uma amostra de sangue colhida e, imediatamente após a colheita, receberam uma dose da vacina X, na dose de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a parição os cordeiros foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o protocolo vacinal administrado. Foi realizada uma colheita de sangue imediatamente antes da primovacinação (com a mesma vacina administrada na mãe). Após 30 dias foi realizado o reforço vacinal e nova colheita de sangue e, uma última colheita de amostra sangüínea 60 dias após a primovacinação (Quadro 1).

Quadro 3: Distribuição dos cordeiros nos protocolos de vacinação de acordo com a idade à primovacinação.

Protocolo	Nº animais	T0 (idade em dias)	T1 (idade em dias)	T2 (idade em dias)
7	6	7	37	67
15	6	15	45	75
30	6	30	60	90
45	6	45	75	105

T0: primovacinação dos cordeiros e colheita de amostra sangüínea.

T1: reforço vacinal e colheita de amostra sangüínea 30 dias após a primovacinação.

T2: colheita de amostra sangüínea 60 dias após a primovacinação.

Protocolo 7: cordeiros primovacinados aos 7 dias de idade.

Protocolo 15: cordeiros primovacinados aos 15 dias de idade.

Protocolo 30: cordeiros primovacinados aos 30 dias de idade.

Protocolo 45: cordeiros primovacinados aos 45 dias de idade.

As colheitas de amostras sangüíneas foram realizadas por punção da veia jugular externa com utilização de tubos estéreis sem anticoagulante e agulhas 25X8mm (Vacuntainer®). As amostras foram transportadas até o Laboratório de Planejamento de Saúde Animal e Veterinária Preventiva da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP, onde permaneceram em repouso à temperatura ambiente, até a completa retração do coágulo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro sangüíneo, estes foram aliqüotados e mantidos a – 20°C, até sua utilização no teste sorológico (ELISA-I), realizado no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos da FMVA – UNESP – Araçatuba/SP.

4.2 Detecção e quantificação de anticorpos antitoxina épsilon

As amostras de soro sangüíneo dos cordeiros foram submetidas individualmente e em duplicata à titulação de anticorpos antitoxina épsilon pela técnica de ELISA-I, segundo a metodologia descrita por Uzal et al. (1997b).

4.2.1 Antígeno

A prototoxina épsilon utilizada como antígeno no teste de ELISA-I, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Enfermidades Infecciosas da FMVA-UNESP Araçatuba/SP produzida por Veschi (2006b).

Para certificar a toxigenicidade da prototoxina épsilon, uma alíquota foi ativada pela adição de solução de tripsina na concentração de 0,05% (MIYATA et al., 2001; UZAL et al., 1999). A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C, por 30 minutos, e diluída nas concentrações 1:10; 1:20; 1:40; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800 em solução peptonada 1%, para determinação da DL₅₀ segundo Reed e Muench (1938). Para cada diluição, foram inoculados dois camundongos (*Balb – c*) pesando entre 17 e 20 g com 0,5 ml por via endovenosa (veia da cauda) e observados por 72 horas. Como controle do teste, dois camundongos foram inoculados nas mesmas condições com o concentrado sem a adição da tripsina.

Associada a avaliação da toxigenicidade da prototoxina foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para caracterização da fração protéica. Adicionou-se na proporção 1:1 toxina e tampão de amostra (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,5% SDS, 10% β – mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,013% azul bromofenol), ferveu-se por cinco minutos previamente à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10% (P/V).

Concentrações entre 10 e 5 µg/ml do antígeno foram testadas.

4.2.2 Amostras de soro padrão

Uma amostra de soro controle negativo utilizado na padronização e posteriormente como controle negativo no teste de ELISA-I foi obtida de cordeiros recém-nascidos privados de colostro ao nascimento. A amostra de soro controle positivo utilizada foi obtida de soro ovino hiperimune liofilizado contendo 180 UI/ml de antitoxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, gentilmente cedido pelo Laboratório de Produção de Materiais de Referência - Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG do município de Pedro Leopoldo (Ofício nº: 48/10 – PMR).

4.2.3 Técnica de ELISA-I

Um volume de 100 µl de solução de antígeno (toxina) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,06M (pH 9,6) na concentração de 10 µg/ml, foi adicionada em cada poço de placas de microtitulação (NUNC[®] Maxisorp-Demarck). As placas permaneceram *overnight* a 4°C em câmara úmida.

Entre as etapas as placas foram lavadas, por quatro vezes, com tampão fosfato salino (0,01 M) acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20[®], pH 7,4 (PBST), em lavadora de placas automática Multiskan Wash[®].

Cada orifício foi bloqueado com 200 µl de tampão bloqueio (tampão carbonato-bicarbonato acrescido de 5% de leite em pó desnatado TCB + LPD 5%), visando evitar reações inespecíficas. A placa foi incubada a 37°C durante 60 minutos.

As amostras de soro controle positivo e negativo e as amostras testes foram diluídas em PBS-T 0,05% na proporção 1/200 e adicionados no volume de 100 µl por orifício. Seis orifícios da placa não receberam soro, sendo que dois orifícios receberam somente tampão, e foram utilizados como controle da placa (branco), outros dois foram o controle do bloqueio utilizado, e dois orifícios como controle do conjugado. As placas foram incubadas a 37°C, por 60 minutos.

Posteriormente, adicionaram-se 100 µl/orifício do conjugado imunoenzimático comercial (Sigma[®] A-3415) correspondente a soro de muar produzido contra IgG ovina, conjugado com peroxidase previamente diluído a 1/8000 em PBS-T 0,05% e incubou-se a 37°C, por 60 minutos.

A seguir adicionaram-se 100 µl/orifício de substrato 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma[®]-A3219), sendo a reação interrompida após dez minutos com *lauryl sulfate sodium dodecyl sulfate*, 98,5% GC (Sigma[®] L-3771) a 1% (100 µl/orifício) e avaliada em densidade óptica (D.O.) em leitora de microplacas de ELISA (Labsystem Multiskan MCC/330[®]) com filtro de 405 nm.

Para interpretação do teste foi utilizada a seguinte fórmula: $A/P = (XA - XN) / XP - XN$; onde, A/P é o valor final em absorbância da amostra teste, XA é a média da densidade óptica (D.O) do soro teste e XN e XP são, respectivamente, as médias das D.Os dos soros controles negativos e positivos.

A conversão dos valores de absorbância em D.O para UI/ml foram calculados a partir da curva de regressão construída com os resultados do teste de ELISA de cinco diluições do soro controle positivo com UI/ml previamente conhecida (180 UI/ml). Animais com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 0,2 UI/ml foram considerados protegidos (Blackwell et al., 1991).

4.2.4 Análise estatística

No presente estudo utilizou-se a técnica de análise de variância não-paramétrica para o esquema de dois fatores (vacina e protocolo) no modelo de medidas repetidas complementadas com o teste de Dunn, considerando o nível de 5% de significância.

5.0 RESULTADOS

A diluição mínima da toxina épsilon ativada inoculada intravenosa em camundongos suficiente para provocar óbito desses animais foi de 1:200. Identificou-se, no gel de eletroforese, uma banda de peso molecular aproximado de 32 kDa compatível com o peso molecular da toxina épsilon. E a concentração de 10 µg/ml da toxina, utilizada como antígeno, foi a que apresentou melhor diferenciação, entre as diferentes concentrações de antitoxina épsilon, amostra de soro controle positivo (180 UI/ml) e amostra de soro controle negativo.

Os valores da resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon UI/ml) de cordeiros submetidos a quatro protocolos distintos de primovacinação com a vacina comercial polivalente, avaliada pela técnica de ELISA-I em diferentes momentos estão descritos na tabela 1 e ilustrado na figura 1.

Comparando-se os protocolos de primovacinação aos 7 ; 15; 30 e 45 dias de idade, fixando-se a vacina administrada nos cordeiros, encontrou-se os seguintes resultados: no momento da primovacinação (T0) somente o protocolo de 30 dias se diferiu dos demais protocolos de 7; 15 e 45 dias; no momento do reforço vacinal (T1) não houve diferença significativa entre os protocolos e trinta dias após o reforço vacinal (T2) somente o protocolo de 7 dias se diferiu dos demais ($p<0,05$).

Tabela 1: Mediana e valores mínimo e máximo da resposta humoral dos cordeiros submetidos a diferentes protocolos de primovacinação contra enterotoxemia com vacina comercial polivalente. Botucatu-SP / 2010.

Vacina	Protocolo (idade em dias na primovacinação)	Momentos de avaliação		
		Primovacinação (T0)	Reforço vacinal (T1)	Pós-reforço vacinal (T2)
X	7	0,369 ^{Aα}	0,127 ^{Aα}	0,324 ^{Aα}
		(0,028; 0,888)	(0,051; 0,643)	(0,180; 0,545)
	15	0,348 ^{Aα}	0,332 ^{Aα}	0,739 ^{Bβ}
		(0,069; 0,578)	(0,218; 0,468)	(0,554; 0,818)
	30	0,739 ^{Bα}	0,456 ^{Aα}	0,652 ^{Bα}
		(0,554; 0,818)	(0,228; 0,706)	(0,410; 0,936)
	45	0,494 ^{Aαβ}	0,277 ^{Aα}	0,662 ^{Bβ}
		(0,092; 0,838)	(0,214; 0,471)	(0,575; 0,842)

Comparação de protocolos fixados a vacina e momento de avaliação

Comparação de momentos fixados a vacina e protocolo.

Protocolo 7: primovacinação aos 7 dias de idade

Protocolo 15: primovacinação aos 15 dias de idade

Protocolo 30: primovacinação aos 30 dias idade

Protocolo 45: primovacinação aos 45 dias de idade

Primovacinação: de acordo com o protocolo

Reforço vacinal: 30 dias após a primovacinação

Pós-reforço: 30 dias após o reforço vacinal

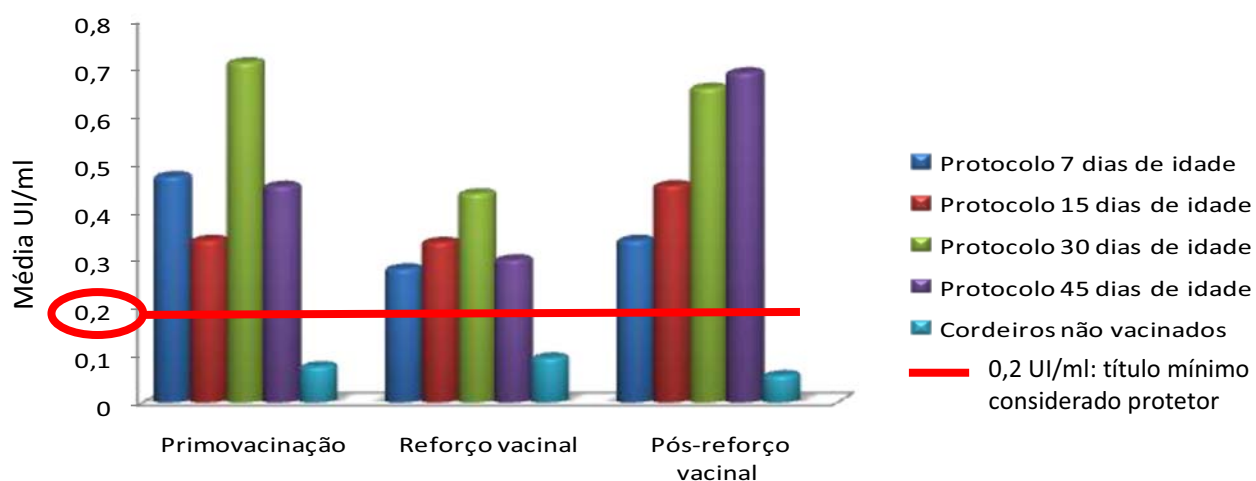


Figura 1: Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) dos cordeiros submetidos a diferentes protocolos de primovacinação com a mesma vacina comercial contra enterotoxemia.

6.0 DISCUSSÃO

As variações iniciais nos títulos de anticorpos séricos antitoxina épsilon devem-se provavelmente à idade dos animais, uma vez que a primovacinação dos cordeiros em um dos protocolos iniciou-se aos sete dias de idade, enquanto nos demais, aos 15, 30 e 45 dias de vida (Tabela 1 e Figura 1). Sabe-se que os animais aos sete dias de idade não apresentam o sistema imunológico completamente desenvolvido, portanto não têm a plenitude da resposta imunológica (TIZARD, 1992). No entanto, diversos ovinocultores do Estado de São Paulo e Minas Gerais adotam protocolos de primovacinação aos sete dias de idade, com dose de reforço vacinal 30 dias após, e não relatam apresentar problemas com enterotoxemia em seus rebanhos.

Apesar de fatores associados às falhas de imunidade após a vacinação, decorrente da incapacidade de formação de anticorpos no caso de alguns animais jovens (TIZARD, 1992; LEITE, 1996), o que não foi evidenciado nas condições do presente estudo. Cordeiros com sete ou quinze dias de idade, após o reforço vacinal, foram imunologicamente competentes apresentando título sérico considerado protetor para a enterotoxemia.

A escolha de estratégias adequadas de imunoprevenção contra a enterotoxemia já foi sugerida por Uzal et al. (1997a).

Diante da escassez de relatos na literatura que confrontassem protocolos de primovacinação para o controle da enfermidade, principalmente nos ovinos, em que perdas ocorrem devido a utilização vacinas ineficientes e protocolos de imunização incorretos.

Com tais achados permite-se inferir que pode haver, por parte dos médicos veterinários no momento da elaboração de calendários zoossanitários de programas de planejamento de saúde de criações de ovinos, certa maleabilidade e otimização do manejo dos cordeiros jovens, concentrando realização de atividades sem que haja risco ou dúvidas do efeito protetor que a vacina irá desencadear.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados da resposta humoral observados em cordeiros vacinados com vacina comercial contra a toxina épsilon, avaliada pelo teste de ELISA-I, permitiram concluir que:

- ✓ Independente do protocolo de primovacinação adotado, todos conferiram título considerado protetor aos cordeiros após o reforço vacinal;
- ✓ O reforço vacinal conferiu aumento significativo na concentração de anticorpos antitoxina épsilon em todos os protocolos de primovacinação testados.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G.; PRESCOTT, J.; WILCOX, B. Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.1147-1152, 1991.

BOARER, C.D.H.; SOJKA, M.G.; WHITE, V.J.; ROEDER, P.L. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **J. Biol. Stand.**, v.16, p.207-218, 1988.

FERNANDEZ MIYAKAWA, M.E.; UZAL, F.A. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 27, p.231-241, 2003.

LEITE, R.C. Diarréia bovina à vírus. In: I SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1996, Guarulhos. **Anais...** Guarulhos, 1996. p.19-20.

MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p.13778-13783, 2001.

PERCIVAL, D.A.; SHUTTLEWORTH, A.D.; WILLIAMSON, E.D.; KELLY, D.C. Anti-idiotypic antibody-induced protection against *Clostridium perfringens* type D. **Infect. Immun.**, v.58, p.2487-2492, 1990.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27, p.493-497, 1938.

SONGER, J.G. 2010

TIZZARD. **Tizzard's veterinary immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v.1, 1992.

UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Serum antibody responses to a *Clostridium perfringens* epsilon toxóide vaccine in goats. **Anaerobe**, v.5, p.287-289, 1999.

UZAL, F.A.; GLASTONBURY, J.R.W.; KELLY, W.R.; THOMAS, R. Caprine enterotoxaemia associate with cerebral microangiopathy. **Vet. Rec.**, v.141, p.224-226, 1997a.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p. BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

UZAL, F. A.; KELLY, W.R.; NIELSEN, K. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.51 p.223-231, 1997b.

VESCHI, J.L.A. **Eficácia de vacina experimental contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos.** 2006. 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CAPÍTULO III

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE
CINCO VACINAS COMERCIAIS
CONTRA ENTEROTOXEMIA EM
CORDEIROS SUBMETIDOS A DOIS
PROTOCOLOS DE
PRIMOVACINAÇÃO**

RESUMO

Objetivou-se avaliar o título protetor sérico de cinco vacinas comerciais contra enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D em cordeiros primovacinados. Cinquenta e nove cordeiros, filhos de ovelhas vacinadas no último mês de gestação, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de acordo com a vacina e protocolo de primovacinação adotado. Para comparação entre as vacinas administradas e os protocolos adotados, segundo o momento de avaliação, foi realizada análise de variância não-paramétrica complementada pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Todas as cinco vacinas comerciais testadas tanto no protocolo de primovacinação aos 30 dias quanto aos 45 dias de idade dos cordeiros confeririam títulos séricos considerados protetores ($\geq 0,2$ UI/ml). Observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) na concentração sérica de anticorpos antitoxina épsilon em duas das cinco vacinas avaliadas.

PALAVRAS-CHAVE: enterotoxemia, vacina, cordeiros

ABSTRACT

The objective was to evaluate the protective titer serum from five commercial vaccines against enterotoxemia caused by Clostridium perfringens epsilon toxin of type D in sheep primed. Fifty-nine lambs, sons the ewes vaccinated in the last month of gestation, were randomly divided into five groups according to the vaccination and primary vaccination protocol adopted. For comparison between the vaccines administered and the protocols used, according to the time of evaluation, analysis of variance was performed nonparametric test complemented by the Dunn multiple comparison. All five commercial vaccines tested in both the protocol as primary vaccination to 30 days to 45 days old lambs confer serum titers considered protective (≥ 0.2 IU / ml). We observed a significant difference ($p \leq 0.05$) in serum concentrations of epsilon antitoxin antibodies in two of the five vaccines evaluated.

Key words: enterotoxemia, lambs, vaccines, vaccination

1.0 INTRODUÇÃO

A toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D é a causa mais comum de quadros de enterotoxemia em ovinos e caprinos de todo o mundo, e geralmente os animais mais jovens e em boas condições nutricionais são os mais acometidos (JANSEN, 1967; BLACKWELL et al., 1983; FLEMING, 1985; FINNIE, 2003).

O tratamento na grande maioria dos casos é impraticável, uma vez que o agente é ubiqüitário do trato digestivo dos animais e do solo, e pela forma de resistência na natureza por meio de esporos, a erradicação da enfermidade torna-se praticamente impossível (SONGER, 2010).

Desse modo, a vacinação é a principal medida profilática adotada para reduzir perdas ou minimizar a severidade da enterotoxemia nos ovinos (FERNANDEZ-MIYKAWA et al., 2003).

A imunidade para a toxina épsilon (ETX), produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D, nesses animais é conferida por anticorpos (BOARER et al., 1988; PERCIVAL et al., 1990), e a concentração sérica de 0,2 UI/ml de antitoxina épsilon tem sido reportada por ser protetora nos ovinos (BLACKWELL et al., 1991).

Embora no mercado veterinário possam ser encontradas diversas vacinas contra toxina épsilon, há uma escassez de estudos relacionados ao teste de eficácia de tais vacinas a campo e acima de tudo nas espécies alvo dessa importante clostridiose dos pequenos ruminantes.

Logo, para a imunização adequada dos animais contra enterotoxemia causada pela ETX é de fundamental importância conhecer a amplitude e duração da resposta sorológica desencadeada pela vacinação frente às condições adversas em que as vacinas são administradas no campo.

2.0 OBJETIVO

Avaliar a resposta sorológica (anticorpos antitoxina épsilon) conferida por cinco vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses submetidas a dois protocolos distintos de acordo com a idade à primovacinação em cordeiros.

3.0HIPÓTESE

As vacinas comerciais contra enterotoxemia, provocada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D, disponíveis no Brasil induzem satisfatoriamente a formação de títulos de anticorpos considerado protetores.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento e origem dos animais

A vacinação e as colheitas das amostras sanguíneas dos animais foram realizadas em uma propriedade rural particular da região sul do estado de São Paulo, localizada nos municípios de Itapetininga (latitude 23°35'30" sul e longitude 48°03'11" oeste), São Miguel Arcanjo (latitude 23°52'42" sul e longitude 47°59'50" oeste) e Sarapuí (latitude 23°38'26" sul e longitude 47°49'29" oeste).

As propriedades rurais apresentavam controle de escrituração zootécnica do rebanho, o que possibilitou a execução do experimento. Não houve alteração do manejo geral, reprodutivo e nutricional das propriedades.

As 59 ovelhas prenhes escolhidas que compunham o lote do experimento eram das raças Texel, Ile de France e mestiças, sem histórico de vacinação contra enterotoxemia nos últimos 24 meses.

A utilização dos animais nesta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP (Botucatu) sob o protocolo nº 57/2008.

4.1.1 Vacinas comerciais

A escolha das vacinas polivalentes, contendo na sua formulação a antitoxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D, ocorreu a partir daquelas mais utilizadas pelos ovinocultores da região sul e centro-sul do Estado de São Paulo. Foram adquiridas em dois estabelecimentos comerciais de insumos agropecuários e, observou-se sistematicamente o prazo de validade e a temperatura de conservação da mesma.

Para manter o sigilo comercial e ético do laboratório produtor, as vacinas utilizadas foram identificadas com as letras A, B, C, D e E. A composição assim como a concentração de antitoxina épsilon presente nas formulações estão descritas no quadro 4.

Quadro 4: Composição das vacinas polivalentes contra clostridioses adquirida no mercado e utilizadas no experimento.

Vacina	Composição	Concentração de antitoxina épsilon descrita pelo fabricante
A	<i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Clostridium septicum</i> ; <i>Clostridium. perfringens</i> B, C e D; <i>Clostridium novyi</i> ; <i>Clostridium sordellii</i> ; <i>Clostridium tetani</i> .	0,5 UI/ml
B	<i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Clostridium botulinum</i> C e D; <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium novyi</i> , <i>Clostridium perfringens</i> B, C e D; <i>Clostridium sordelli</i>	0,5 UI/ml
C	<i>Clostridium perfringens</i> A; B; C; D; <i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Clostridium novy</i> ; <i>Clostridium septicum</i> ; <i>Clostridium tetani</i> ; <i>Clostridium sordelli</i> ; <i>Clostridium haemolyticum</i> .	0,5 UI/ml
D	<i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Clostridium septicum</i> ; <i>Clostridium novyi</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> A, B, C, D e E	0,5 UI/ml
E	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium. novyi</i> , <i>Clostridium sordellii</i> , <i>Clostridium perfringens</i> B, C, D; <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium tetani</i> ; <i>Clostridium botulinum</i> C e D	0,5 UI/ml

4.1.2 Protocolos vacinais e colheitas de amostras sangüíneas

Foi realizada uma triagem prévia no rebanho da propriedade rural para identificação de ovelhas prenhes (primíparas e/ou múltíparas) e hígidas que se encontravam por volta do início do último mês de gestação. As ovelhas escolhidas tiveram uma amostra de sangue colhida e, imediatamente após a colheita, receberam uma dose da vacina A, B, C, D ou E, na dose de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a parição os cordeiros foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de acordo com a vacina e protocolo vacinal administrado (primovacinação aos 30 ou 45 dias de idade). Foi realizada uma colheita de sangue imediatamente antes da primovacinação (com a mesma vacina administrada na mãe). Após 30 dias foi realizado o reforço vacinal e nova colheita de sangue e, uma última colheita de amostra sangüínea 60 dias após a primovacinação (Quadro 3).

Quadro 5: Distribuição dos cordeiros, de acordo com a vacina administrada e protocolo de vacinação.

Protocolos (idade em dias à primovacinação)	Vacina / nº animais	T0 (idade em dias)	T1 (idade em dias)	T2 (idade em dias)
30	A (n = 7)	30	60	90
	B (n = 7)			
	C (n = 5)			
	D (n = 5)			
	E (n = 4)			
45	A (n = 7)	45	75	105
	B (n = 8)			
	C (n = 5)			
	D (n = 6)			
	E (n = 5)			

T0: primovacinação dos cordeiros e colheita de amostra sangüínea.

T1: reforço vacinal e colheita de amostra sangüínea 30 dias após a primovacinação.

T2: colheita de amostra sangüínea 60 dias após a primovacinação.

Protocolo 30: cordeiros primovacinados aos 30 dias de idade.

Protocolo 45: cordeiros primovacinados aos 45 dias de idade.

As colheitas de amostras sangüíneas foram realizadas por punção da veia jugular externa com utilização de tubos estéreis sem anticoagulante e agulhas 25X8mm (Vacuntainer®). As amostras foram transportadas até o Laboratório de Planejamento de Saúde Animal e Veterinária Preventiva da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP, onde permaneceram em repouso à temperatura ambiente, até a completa retração do coágulo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro sangüíneo, estes foram aliqüotados e mantidos a – 20°C, até sua utilização no teste sorológico (ELISA-

I), realizado no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos da FMVA – UNESP – Araçatuba/SP.

4.2 Detecção e quantificação de anticorpos antitoxina épsilon

As amostras de soro sangüíneo dos cordeiros foram submetidas individualmente e em duplicata à titulação de anticorpos antitoxina épsilon pela técnica de ELISA-I, segundo a metodologia descrita por Uzal et al. (1997b).

4.2.1 Antígeno

A prototoxina épsilon utilizada como antígeno no teste de ELISA-I, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Enfermidades Infecciosas da FMVA-UNESP Araçatuba/SP produzida por Veschi (2006b).

Para certificar a toxigenicidade da prototoxina épsilon, uma alíquota foi ativada pela adição de solução de tripsina na concentração de 0,05% (MIYATA et al., 2001; UZAL et al., 1999). A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C, por 30 minutos, e diluída nas concentrações 1:10; 1:20; 1:40; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800 em solução peptonada 1%, para determinação da DL₅₀ segundo Reed e Muench (1938). Para cada diluição, foram inoculados dois camundongos (*Balb – c*) pesando entre 17 e 20 g com 0,5 ml por via endovenosa (veia da cauda) e observados por 72 horas. Como controle do teste, dois camundongos foram inoculados nas mesmas condições com o concentrado sem a adição da tripsina.

Associada a avaliação da toxigenicidade da prototoxina foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para caracterização da fração protéica. Adicionou-se na proporção 1:1 toxina e tampão de amostra (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,5% SDS, 10% β – mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,013% azul bromofenol), ferveu-se por cinco minutos previamente à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10% (P/V).

Concentrações entre 10 e 5 µg/ml do antígeno foram testadas.

4.2.2 Amostras de soro padrão

Uma amostra de soro controle negativo utilizado na padronização e posteriormente como controle negativo no teste de ELISA-I foi obtida de cordeiros recém-nascidos privados de colostro ao nascimento. A amostra de soro controle positivo utilizada foi obtida de soro ovino hiperimune liofilizado contendo 180 UI/ml de antitoxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, gentilmente cedido pelo Laboratório de Produção de Materiais de Referência - Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG do município de Pedro Leopoldo (Ofício nº: 48/10 – PMR).

4.2.3 Técnica de ELISA-I

Um volume de 100 µl de solução de antígeno (toxina) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,06M (pH 9,6) na concentração de 10 µg/ml, foi adicionada em cada poço de placas de microtitulação (NUNC® Maxisorp-Demarck). As placas permaneceram *overnight* a 4°C em câmara úmida.

Entre as etapas as placas foram lavadas, por quatro vezes, com tampão fosfato salino (0,01 M) acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20®, pH 7,4 (PBST), em lavadora de placas automática Multiskan Wash®.

Cada orifício foi bloqueado com 200 µl de tampão bloqueio (tampão carbonato-bicarbonato acrescido de 5% de leite em pó desnatado TCB + LPD 5%), visando evitar reações inespecíficas. A placa foi incubada a 37°C durante 60 minutos.

As amostras de soro controle positivo e negativo e as amostras testes foram diluídas em PBS-T 0,05% na proporção 1/200 e adicionados no volume de 100 µl por orifício. Seis orifícios da placa não receberam soro, sendo que dois orifícios receberam somente tampão, e foram utilizados como controle da placa (branco), outros dois foram o controle do bloqueio utilizado, e dois orifícios como controle do conjugado. As placas foram incubadas a 37°C, por 60 minutos.

Posteriormente, adicionaram-se 100 µl/orifício do conjugado imunoenzimático comercial (Sigma® A-3415) correspondente a soro de muar

produzido contra IgG ovina, conjugado com peroxidase previamente diluído a 1/8000 em PBS-T 0,05% e incubou-se a 37°C, por 60 minutos.

A seguir adicionaram-se 100 µl/orifício de substrato 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma®-A3219), sendo a reação interrompida após dez minutos com *lauryl sulfate sodium dodecyl sulfate*, 98,5% GC (Sigma® L-3771) a 1% (100 µl/orifício) e avaliada em densidade óptica (D.O.) em leitora de microplacas de ELISA (*Labsystem Multiskan MCC/330*®) com filtro de 405 nm.

Para interpretação do teste foi utilizada a seguinte fórmula: $A/P = (XA - XN) / XP - XN$; onde, A/P é o valor final em absorbância da amostra teste, XA é a média da densidade óptica (D.O) do soro teste e XN e XP são, respectivamente, as médias das D.Os dos soros controles negativos e positivos.

A conversão dos valores de absorbância em D.O para UI/ml foram calculados a partir da curva de regressão construída com os resultados do teste de ELISA de cinco diluições do soro controle positivo com UI/ml previamente conhecida (180 UI/ml). Animais com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 0,2 UI/ml foram considerados protegidos (Blackwell et al., 1991).

4.2.4 Análise estatística

No presente estudo utilizou-se a técnica de análise de variância não-paramétrica para o esquema de dois fatores (vacina e protocolo) no modelo de medidas repetidas complementadas com o teste de Dunn, considerando o nível de 5% de significância.

5.0 RESULTADOS

A diluição mínima da toxina épsilon ativada inoculada intravenosa em camundongos suficiente para provocar óbito desses animais foi de 1:200. Identificou-se, no gel de eletroforese, uma banda de peso molecular aproximado de 32 kDa compatível com o peso molecular da toxina épsilon. E a concentração de 10 µg/ml da toxina, utilizada como antígeno, foi a que apresentou melhor diferenciação, entre as diferentes concentrações de antitoxina épsilon, amostra de soro controle positivo (180 UI/ml) e amostra de soro controle negativo.

Os valores da resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon UI/ml) de cordeiros submetidos a quatro protocolos distintos de primovacinação com a vacina comercial polivalente, avaliada pela técnica de ELISA-I em diferentes momentos estão descritos na tabela 2 e ilustrado nas figuras 2 e 3.

Frente ao protocolo 3, as vacinas A e B não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no momento T0, porém se diferiram das demais vacinas C, D e E. Em T1, somente as vacinas B, D e E apresentaram comportamento sem diferença significativa, já as vacinas C e A tiveram comportamento distinto com diferença significativa ($p < 0,05$). E em T2, não encontrou-se diferença significativa entre as vacinas A e E, assim como entre B e D ($p > 0,05$), apenas a vacina C diferiu-se significativamente das demais.

No entanto, analisando o comportamento das vacinas submetidas ao protocolo 4, houve mudanças nos resultados encontrados: em T0 e T1 não houveram diferenças significativas entre as cinco vacinas estudadas, já em T2, as vacinas A e C comportaram-se de maneira semelhante entre si porém com diferença significativa ($p < 0,05$) das demais vacinas B, D e E.

Quanto ao protocolo de vacinação, inicialmente (T0), para as vacinas A e D houve diferença significativa entre os protocolos 3 e 4, já para as demais vacinas essa diferença não existiu, ou seja, as vacinas se comportaram de forma semelhante tanto no protocolo de primovacinação aos 30 quanto aos de 45 dias. Exceto para a vacina C, onde a diferença entre os protocolos se

revelou a partir do momento T1 e T2, sendo que a média de anticorpos foi significativamente maior no protocolo 3.

Tabela 2: Mediana e valores mínimo e máximo da resposta humoral em cordeiros segundo a vacina, protocolo de vacinação e momento de avaliação.

Vacina	Protocolo	Primovacinação (T0)	Momento de avaliação	
			Booster (T1)	Pós-booster (T2)
A	P3	0,739 (0,554; 0,818) ^{bBa}	0,456 (0,228; 0,706) ^{abAα}	0,652 (0,410; 0,936) ^{bAα}
	P4	0,494 (0,092; 0,839) ^{aAαβ}	0,277 (0,214; 0,471) ^{aAα}	0,662 (0,575; 0,842) ^{bAβ}
	P3	0,766 (0,218; 0,833) ^{bAβ}	0,293 (0,199; 0,529) ^{aAα}	0,263 (0,122; 0,470) ^{aAα}
B	P4	0,501 (0,035; 0,720) ^{aAβ}	0,205 (0,025; 0,330) ^{aAα}	0,364 (0,014; 0,748) ^{aAαβ}
	P3	0,237 (0,129; 0,587) ^{aAα}	0,591 (0,325; 0,786) ^{bBβ}	1,055 (0,606; 1,386) ^{cBY}
C	P4	0,457 (0,184; 0,517) ^{aAαβ}	0,305 (0,173; 0,403) ^{aAα}	0,595 (0,233; 0,731) ^{bAβ}
	P3	0,262 (0,105; 0,652) ^{aAα}	0,252 (0,057; 0,354) ^{aAα}	0,171 (0,072; 0,819) ^{aAα}
D	P4	0,547 (0,043; 0,683) ^{aBβ}	0,299 (0,058; 0,434) ^{aAα}	0,273 (0,185; 0,413) ^{aAα}
	P3	0,389 (0,152; 0,589) ^{aAα}	0,285 (0,082; 0,345) ^{aAα}	0,468 (0,183; 1,018) ^{bAα}
E	P4	0,387 (0,205; 0,527) ^{aAα}	0,374 (0,060; 0,617) ^{aAα}	0,301 (0,035; 0,517) ^{aAα}

Comparação de vacinas fixados o protocolo e momento de avaliação Comparação de protocolos fixados a vacina e momento de avaliação Comparação de momentos fixados a vacina e protocolo.

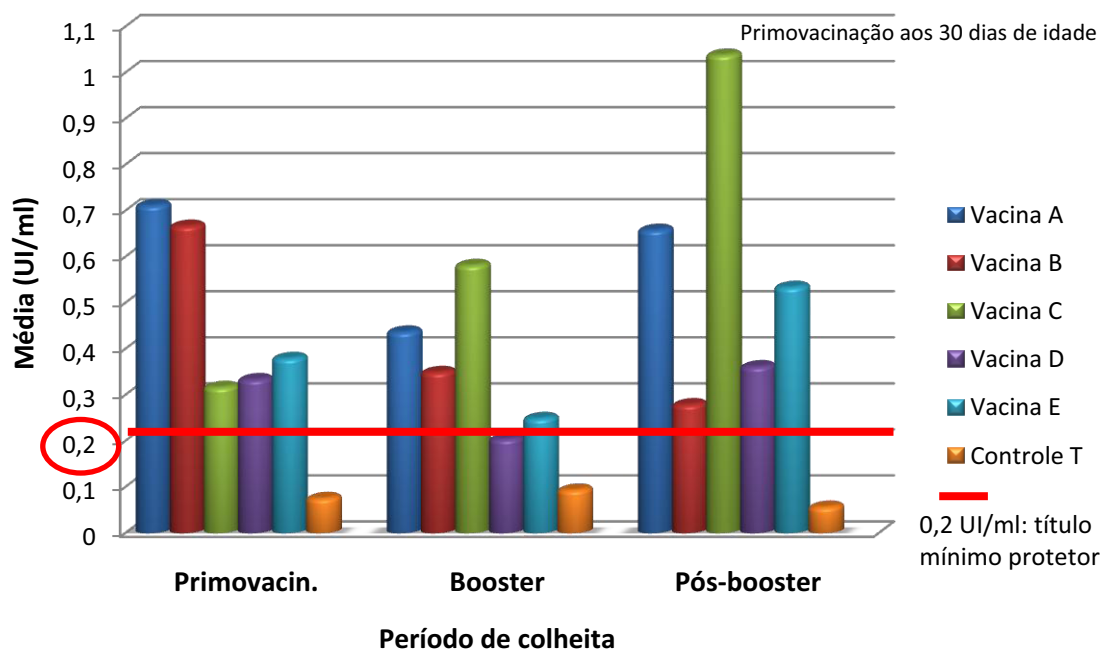


Figura 2: Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) dos cordeiros submetidos ao protocolo de primovaccinação aos 30 dias de idade com cinco vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses.

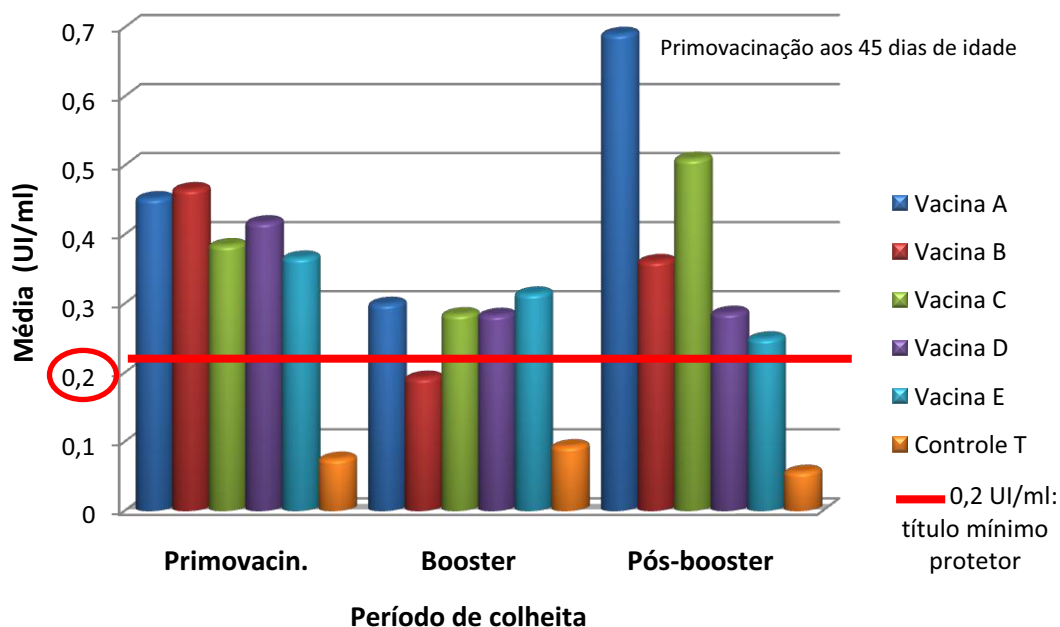


Figura 3: Resposta humoral (anticorpos antitoxina épsilon) dos cordeiros submetidos ao protocolo de primovaccinação aos 45 dias de idade com cinco vacinas comerciais polivalentes contra clostridioses.

6.0 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, as cinco vacinas avaliadas conferiram títulos de anticorpos séricos considerados protetores tanto nos protocolos de primovacinação aos 30 ou 45 dias de idade, ou seja, apresentaram concentração sérica maior ou igual a 0,2 UI/ml de antitoxina épsilon circulante. Houve um destaque para a vacina C quando submetida ao protocolo de 30 dias de idade e vacina A quando avaliada no protocolo de 45 dias, que conferiram títulos mais elevados quando comparadas com as demais vacinas avaliadas.

Tais resultados diferem daqueles obtidos por Lobato et al. (2000) e Azevedo et al. (1998) que testaram a resposta de antitoxinas beta e épsilon de *C. perfringens* induzida em coelhos e bovinos por vacinas comerciais no Brasil. Eles observaram que somente a vacina importada, no estudo realizado por Azevedo et al., e duas de seis vacinas testadas por Lobato et. al., induziram respostas de anticorpos neutralizantes.

No presente estudo também ficou evidenciado o aumento na concentração dos anticorpos específicos após o reforço vacinal nas cinco vacinas testadas, demonstrando a importância da dose de reforço no aumento e na manutenção do nível de anticorpos antitoxina épsilon.

Os resultados estão de acordo com os estudos de Sterne et al. (1964) e Jansen (1967), que mostraram a importância da vacinação de reforço para adequada imunidade. O mesmo achado ainda confirmam os resultados obtidos por Veschi et al., (2006a) em caprinos e Lobato et al. (2000) e Kennedy et al. (1977) em bovinos.

Apesar de Blackwell et al. (1991) e Rogers; Swecker (1997) relatarem que a qualidade das vacinas é extremamente variável entre países e entre os laboratórios produtores, e que nem sempre as vacinas são corretamente armazenadas, transportadas e administradas, no presente estudo tais eventos não foram evidenciados comprovando a eficácia das cinco vacinas submetidas ao teste de campo.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados da resposta humoral observados em cordeiros vacinados com vacinas comerciais contra a toxina épsilon, avaliada pelo teste de ELISA–I, permitiram concluir que:

- ✓ As cinco vacinas comerciais testadas, nas condições do presente estudo, resultaram em título de anticorpos antitoxina épsilon considerado protetor aos cordeiros.
- ✓ Não houve diferença considerada significativa nos protocolos de primovacinação aos 30 ou 45 dias de idade para as cinco vacinas avaliadas.
- ✓ O reforço vacinal conferiu aumento significativo na concentração de anticorpos antitoxina épsilon.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L. MAIA, J. D.; NASCIMENTO, R. A.P. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.50, p.239-242, 1998.

BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G.; PRESCOTT, J.; WILCOX, B. Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.1147-1152, 1991.

BLACKWELL, T.E.; BUTLER, D.G.; BELL, J. A. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids. **Can. J. Comp. Med.**, v.47, p.127-132, 1983.

FERNANDEZ MIYAKAWA, M.E.; UZAL, F.A. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 27, p.231-241, 2003.

FINNIE, J.W. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review. **Aust. Vet. J.**, v.81, p.219-221, 2003.

FLEMMING, S. Enterotoxemia in neonatal calves. **Food Anim. Pract.**, v.1, p.509-514, 1985.

JANSEN, B.C. The duration of immunity of pulpy kidney disease of sheep. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, v.34, p.333-334, 1967.

KENNEDY, K.K.; NORRIS, S.J.; BECKENHAUER, W.H.; WHITE, R.G. Vaccination of cattle and sheep with a combined *Clostridium perfringens* types C and D toxoid. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p.1515-1517, 1979.

LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R.A.; MARTINS, N.E.; GONÇALVES, L.C.B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, p.313-318, 2000.

ROGERS, G.M.; SWECKER, W.S. Clostridial vaccines: timing and quality assurance. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.19, p.278-285, 1997.

SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Vet. Microbiol.** v.140, p.399-404. 2010.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

STERNE, M.; WARRACK, G. H. The types of *Clostridium perfringens*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 88, p.279-283, 1964.

UZAL, F. A.; KELLY, W.R.; NIELSEN, K. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.51 p.223-231, 1997.

VESCHI, J.L.A.; DUTRA, I.S.; MIYAKAWA, M.E.F.; PERRI, S.H.V.; UZAL, F. A. Immunoprophylactic strategies against enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p. 51-54, 2006a.

VESCHI, J.L.A. **Eficácia de vacina experimental contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos**. 2006. 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006b.

CAPÍTULO IV

**CINÉTICA DOS ANTICORPOS
COLOSTRAIS CONTRA
ENTEROTOXEMIA EM CORDEIROS**

Trabalho enviado para revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**Cinética dos anticorpos colostrais contra enterotoxemia em
cordeiros¹**

**Heni F. Costa², Selene D. Babboni², Carlos F.C. Rodrigues³,
Iveraldo S. Dutra⁴, Carlos R. Padovani⁵, José R. Modolo^{2*}**

ABSTRACT. – Costa H.F., Babboni, S.D., Rodrigues, C.F.C., Dutra I.S., Padovani, C.R. & Modolo J.R. 2010. [Kinetics of colostral antibodies account enterotoxemia in lambs.] Cinética dos anticorpos cordeiros contra enterotoxemia em cordeiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/nº Botucatu, SP 18618-970 Cx. P.: 524, Brazil. Email: jrmodolo@fmvz.unesp.br

The aim of this study was to quantify and compare the serum antibody epsilon antitoxin in ewes and their lambs in different situations. Twelve sheep were divided into two groups, non-vaccinated and vaccinated in the last month of pregnancy against enterotoxemia caused by the action of epsilon toxin of Clostridium perfringens type D. Blood samples were collected both as the sheep of their lambs, immediately postpartum, 30 and 60 days. Quantitation of epsilon antitoxin antibodies, performed by ELISA-I, revealed a significant difference ($p > 0.05$) in mean concentrations of epsilon antitoxin antibodies of the lambs of ewes vaccinated children for those children of non-vaccinated sheep.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/nº, Botucatu, SP 18618-970 Cx. Postal 524, Brasil. *Autor para correspondência: jrmodolo@fmvz.unesp.br

³ Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

⁴ Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Rod. Gladys Bernardes Minhoto km 62. Itapetininga, SP 18200-970, Brasil.

⁵ Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Clóvis Pestana, 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil.

Since the titers of the group of children of mothers were vaccinated lambs was higher than 0.2 IU / ml, ie considered protective throughout the study period under the conditions of this study.

INDEX TERMS: enterotoxaemia, vaccine, lambs, colostrum

RESUMO. - O objetivo do presente estudo foi quantificar e comparar a concentração sérica de anticorpos antitoxina épsilon em ovelhas e seus cordeiros em diferentes situações. Doze ovelhas foram divididas em dois grupos, não-vacinadas e vacinadas no último mês de gestação contra enterotoxemia causada pela ação da toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D. Amostras sanguíneas foram colhidas, tanto das ovelhas quanto de seus respectivos cordeiros, imediatamente pós-parto, 30 e 60 dias após. A quantificação de anticorpos antitoxina épsilon, realizada pela técnica de ELISA-I, revelou que houve diferença significativa ($p > 0,05$) na média da concentração de anticorpos antitoxina épsilon dos cordeiros filhos de ovelhas vacinadas para aqueles filhos de ovelhas não-vacinadas. Sendo que, os títulos séricos do grupo de cordeiros filhos de matrizes vacinadas foi superior a 0,2 UI/ml, ou seja, considerado protetor ao longo de todo período avaliado nas condições do presente estudo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: enterotoxemia, vacina, cordeiros, colostro

INTRODUÇÃO

A toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D é a causa mais comum de quadros de enterotoxemia em ovinos e caprinos de todo o mundo, e geralmente os animais mais jovens e em boas condições nutricionais são os mais acometidos (Jansen, 1967; Blackwell et al. 1983; Fleming, 1985; Finnie, 2003).

O tratamento na grande maioria dos casos é impraticável, uma vez que o agente é ubiqüitário do trato digestivo dos animais e do solo, e pela forma de resistência na natureza por meio de esporos, a erradicação da enfermidade torna-se praticamente impossível (Songer, 2010).

Desse modo, a vacinação é a principal medida profilática adotada para reduzir perdas ou minimizar a severidade da enterotoxemia nos ovinos (Fernandez-Miykawa et al. 2003). Apesar da passagem de anticorpos maternos patógeno-específico durante a gestação ser considerada outra forma de proteção para os recém-nascidos, nos ovinos a complexidade da placenta do tipo sindesmocorial, constituída de cinco camadas de tecidos determina a transferência de imunidade passiva pós-natal, sendo a ingestão de colostro essencial para a aquisição de anticorpos maternos (Brambell, 1958; Jeffcott, 1972; Campbel & Seigel, 1977).

A concentração sérica de 0,2 UI/ml de antitoxina épsilon tem sido reportada por ser protetora nos ovinos (Blackwell et al. 1991). Mesmo produzida normalmente em pequena quantidade no intestino de animais, a toxina épsilon, nessa condição, não acarreta nenhum efeito deletério e até estimula a formação de anticorpos específicos (Blackwell et al. 1983). Entretanto, pode não estimular a formação de títulos séricos de antitoxina épsilon com magnitude suficiente para promover a proteção contra os efeitos da toxina liberada no trato intestinal quando a enterotoxemia é desencadeada (Griner, 1961).

Logo, para a imunização adequada dos animais contra enterotoxemia causada pela ETX é de fundamental importância conhecer a amplitude e duração da resposta sorológica desencadeada pela transferência de anticorpos colostrais nos cordeiros frente às condições adversas do manejo a campo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a concentração de anticorpos antitoxina épsilon de cordeiros não-vacinados imediatamente após o nascimento, aos trinta e sessenta dias de idade, filhos de ovelhas vacinadas e não-vacinadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Doze ovelhas híbridas prenhes foram divididas em dois grupos, vacinadas no último mês de gestação contra enterotoxemia e não vacinadas. Colheu-se uma amostra de sangüínea da veia jugular de todos os animais trinta dias antes da parição.

Imediatamente o parto colheu-se uma amostra sangüínea dos cordeiros, antes que ingerissem o colostro, e das ovelhas. Novas colheitas foram realizadas após 30 e 60 dias da parição.

A utilização dos animais nesta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP (Botucatu) sob o protocolo nº 57/2008.

ELISA-I

Para quantificação dos anticorpos antitoxina épsilon foi escolhida a técnica de ELISA-I segundo Uzal et al. (1997). A prototoxina épsilon utilizada como antígeno no ELISA-I, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Enfermidades Infecciosas da FMVA-UNESP Araçatuba/SP produzida por Veschi (2006b). A avaliação de toxigenicidade da prototoxina épsilon foi realizada de acordo com Sayeed et al. (2005), associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS 12%) (Asubel et al. 1994). Concentrações de 10 a 2,5 µg/ml do antígeno foram testadas.

Um volume de 100 µl de solução de antígeno (toxina) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,06M (pH 9,6), foi adicionada em cada poço de placas de microtitulação (NUNC[®] Maxisorp-Demarck). As placas permaneceram *overnight* a 4°C em câmara úmida. Entre as etapas as placas foram lavadas, por quatro vezes, com tampão fosfato salino (0,01 M) acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20[®], pH 7,4 (PBST), em lavadora de placas automática Multiskan Wash[®]. O bloqueio foi realizado com 200 µl de tampão (tampão carbonato-bicarbonato acrescido de 5% de leite em pó desnatado TCB + LPD 5%), visando evitar reações inespecíficas. Após incubação durante 60 minutos a 37°C, 100 µl de amostras de soro controle positivo (180 UI/ml de antitoxina épsilon) e negativo homólogos e as amostras testes diluídas em PBS-T 0,05% na proporção 1/200 foram adicionadas em cada orifício. Seis orifícios da placa não receberam soro, sendo que dois orifícios receberam somente tampão, e foram utilizados como controle da placa (branco), outros dois foram o controle do bloqueio utilizado, e dois orifícios como controle do conjugado. As placas foram incubadas a 37°C, por 60 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 100 µl/orifício do conjugado imunoenzimático comercial (Sigma[®] A-3415)

correspondente a soro de muar produzido contra IgG ovina, conjugado com peroxidase previamente diluído a 1/8000 em PBS-T 0,05% e incubou-se a 37°C, por 60 minutos. A seguir adicionaram-se 100 µl/orifício de substrato 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma®-A3219), sendo a reação interrompida após dez minutos com *lauryl sulfate sodium dodecyl sulfate*, 98,5% GC (Sigma® L-3771) a 1% (100 µl/orifício) e avaliada em densidade óptica (D.O.) em leitora de microplacas de ELISA (*Labsystem Multiskan MCC/330*®) com filtro de 405 nm.

Para interpretação do teste foi utilizada a seguinte fórmula: $A/P = (XA - XN) / XP - XN$; onde, A/P é o valor final em absorbância da amostra teste, XA é a média da densidade óptica (D.O) do soro teste e XN e XP são, respectivamente, as médias das D.Os dos soros controles negativos e positivos.

A conversão dos valores de absorbância em D.O para UI/ml foram calculados a partir da curva de regressão construída com os resultados do teste de ELISA de cinco diluições do soro controle positivo com UI/ml previamente conhecida (180 UI/ml). Animais com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 0,2 UI/ml foram considerados protegidos (Blackwell et al., 1991).

Análise estatística

No presente estudo utilizou-se a técnica de análise de variância não-paramétrica para o esquema de dois fatores (vacina e protocolo) no modelo de medidas repetidas complementadas com o teste de Dunn, considerando o nível de 5% de significância.

RESULTADOS

A diluição mínima da toxina épsilon ativada inoculada intravenosa em camundongos suficiente para provocar óbito desses animais foi de 1:200. Identificou-se, no gel de eletroforese, uma banda de peso molecular aproximado de 32 kDa compatível com o peso molecular da toxina épsilon. E a

concentração de 10 µg/ml da toxina, utilizada como antígeno, foi a que apresentou melhor diferenciação, entre as diferentes concentrações de antitoxina épsilon, amostra de soro controle positivo (180 UI/ml) e amostra de soro controle negativo.

A avaliação imediata após o parto da concentração de anticorpos antitoxina épsilon apresentada pelo grupo de cordeiros filhos de mães vacinadas e não vacinadas foi similar, não apresentando diferença significativa ($p>0,05$). Quando avaliados aos 30 e 60 dias de idade, a diferença entre as médias de anticorpos nesses animais passou a ser significativa ($p<0,05$), sendo o título maior nos cordeiros filhos de mães vacinadas. Quanto aos momentos avaliados, não houve diferença significativa na média de anticorpos antitoxina épsilon do grupo de cordeiros filhos de ovelhas não-vacinadas, enquanto para os outros cordeiros, houve diferença significativa nos três momentos avaliados nas condições do presente estudo (Tabela 3 e Figura 4).

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, cordeiros filhos de ovelhas sem histórico de vacinação no último ano, apresentaram título sérico de anticorpos antitoxina épsilon, porém não era considerado protetor ($<0,2$ UI/ml). Porém, quando avaliada a concentração desses anticorpos específicos no grupo de cordeiros filhos de matrizes vacinadas cerca de 30 dias antes da parição, o título encontrado foi considerado protetor ao longo do período avaliado.

Tais resultados estão de acordo com encontrados por De la Rosa et al. (1997), em que os cordeiros filhos de mães vacinadas 30 dias antes do parto e mantiveram ao longo de várias semanas. A importância da oferta do colostro aos ruminantes já foi evidenciada nos bovinos, Troxel et al. (1997) e Araújo et al. (2010) evidenciaram que a vacinação de vacas prenhes pré-parto induz resposta satisfatória aos seus bezerros.

A concentração de anticorpos antitoxina épsilon encontrada nas ovelhas sem histórico de vacinação prévia e de seus cordeiros deve-se provavelmente devido às características ecológicas do *C. perfringens*, que é ubiqüitário do trato digestivo dos animais, e, a pequena produção da toxina em doses subletais pelo agente estimula a produção de anticorpos específicos (Jansen,

1967). Assim como Bullen (1954) demonstrou a existência de intoxicação pela toxina épsilon subclínica em ovinos, Blackwell et al. (1983) relatou que mais de 54% de ovinos provenientes de rebanho não vacinado apresentavam concentração sérica de anticorpos antitoxina épsilon.

No entanto, essa concentração de anticorpos conferida em condições naturais de exposição à toxina épsilon não estimula a indução de títulos séricos considerados suficientes para proteger ou amenizar os efeitos da enterotoxemia quando desencadeada (Blackwell et al., 1983; Songer, 2010). Nas condições do presente estudo, apesar das ovelhas não vacinadas terem apresentado título acima de 0,2 UI/ml, este não foi suficiente para promover proteção aos seus cordeiros pela passagem de anticorpos específicos via colostro, o que pode ser evidenciado no grupo de cordeiros filhos de ovelhas vacinadas no último mês de gestação reforçando a importância da vacinação de ovelhas prenhes para garantir a transferência de anticorpos patógeno-específico aos seus cordeiros.

CONCLUSÕES

Os resultados da resposta humoral observados em ovelhas vacinadas e não-vacinadas e seus cordeiros avaliados pelo teste de ELISA-I permitiram concluir que:

- ✓ A vacinação de ovelhas prenhes trinta dias antes da parição confere título de anticorpos séricos antitoxina épsilon considerados protetores aos seus cordeiros ao longo do período avaliado.
- ✓ Cordeiros filhos de ovelhas não-vacinadas não apresentaram título antitoxina épsilon sérico considerado protetor.

Agradecimentos: Professores Dr^a. Cáris Maroni Nunes e Dr. Guilherme de Paula Nogueira da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba UNESP.

REFERÊNCIAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1994. **Current Protocols in Molecular Biology**. Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Araújo, R.F.; Curci, V.C.L.M.; Nóbrega, F.L.C.; Ferreira, R.M.M. & Dutra, I.S. 2010. Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. **Pesq. Vet. Bras.** 30:00-00.
- Blackwell, T.E.; Butler, D.G.; Prescott, J. & Wilcox, B. 1991. Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. **Am. J. Vet. Res.** 52:1147-1152.
- Blackwell, T.E.; Butler, D.G. & Bell, J. A. 1983. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids. **Can. J. Comp. Med.** 47:127-132.
- Bullen, T.O.; Nervig, R.M. & Pemberton, J.R. 1970. Metallic salts as adjuvants for veterinary biologics, In: KADIS, S.; MONTIE, T.C.; AJL, S.J. (Eds.). **Microbial toxins**. New York: Academia Press, v.2A.
- Brambel, J.W.R. 1958. The passive immunity of the young mammal. **Biol. Rev.** 33:488-531.
- Campbel, S.G.; Siegel, M.J. & Knowlton, B.J. 1977. Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lambs. **New Zel. Vet. J.** 25:361-367.
- De la Rosa, C.; Hougue, D. E. & Thonney, M. L. 1997. Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. **J. Anim. Sci.** 75:2328-2334.
- Fernandez-Miyakawa, M.E.; Uzal, F.A. 2003. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. **Vet. Res. Commun.**, 27:231-241.
- Flemming, S. 1985. Enterotoxemia in neonatal calves. **Food Anim. Pract.**, 1:509-514.
- Griner, L.A. 1961. Enterotoxaemia of sheep. III. *Clostridium perfringens* type D antitoxin titres of normal, novaccinated lambs. **Am. J. Vet. Res.** 22:447-448.
- Jansen, B.C. 1967. The duration of immunity of pulpy kidney disease of sheep. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, 34:333-334.
- Jeffcott, L.B. 1972. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biol. Rev.**, 47:439-464.
- Sayeed, S.; Fernandez-Miyakawa, M.E.; Fisher, D.J.; Adams, V.; Poon, R.; Rood, J.I.; Uzal, F.A.; & McClane, B.A. 2005. Epsilon-Toxin Is Required for Most *Clostridium perfringens* Type D. **Infect. Immun.** 73(11):7413-7421.
- Songer, J.G. 2010. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Vet. Microbiol.** v.140, p.399-404.

Troxel, T.R.; Burke, G.L.; Wallace, W.T.; Keaton, L.W.; McPeake S. R.; Smith, D.; & Nicholson, I. 1997. Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. **J. Anim. Sci.**, v.75. p.19-25.

Uzal, F. A.; Kelly, W.R. & Nielsen, K. 1997. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.51 p.223-231.

Veschi, J.L.A. 2006. **Eficácia de vacina experimental contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos.** 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

Tabela 3: Medidas descritivas de anticorpos antitoxina épsilon (UI/ml) segundo grupo e momento de avaliação.

Animal	Grupos	Momento de avaliação		
		T0	T30	T60
Cordeiro	Controle	0,042 (0,014; 0,236) ^{aA}	0,094 (0,073; 0,118) ^{aA}	0,058 (0,042; 0,073) ^{aA}
	Total	0,076 ± 0,082	0,094 ± 0,016	0,057 ± 0,012
	Controle	0,129 (0,045; 0,161) ^{aA}	0,270 (0,046; 0,442) ^{bAB}	0,298 (0,046; 0,515) ^{bB}
	Parcial	0,121 ± 0,041	0,249 ± 0,150	0,278 ± 0,185
Matriz	Controle	0,173 (0,080; 0,275) ^{aA}	0,254 (0,221; 0,575) ^{aA}	0,273 (0,139; 0,300) ^{aA}
	Total	0,166 ± 0,075	0,343 ± 0,151	0,231 ± 0,075
	Controle	0,307 (0,172; 0,360) ^{aA}	0,461 (0,179; 0,853) ^{aA}	0,441 (0,233; 0,565) ^{aA}
	Parcial	0,294 ± 0,066	0,486 ± 0,285	0,426 ± 0,115

Letras minúsculas: comparação dos grupos fixados o momento de avaliação

Letras maiúsculas: comparação de momentos fixado o grupo.

T0: imediatamente após o nascimento

T30: 30 dias de idade

T60: 60 dias de idade

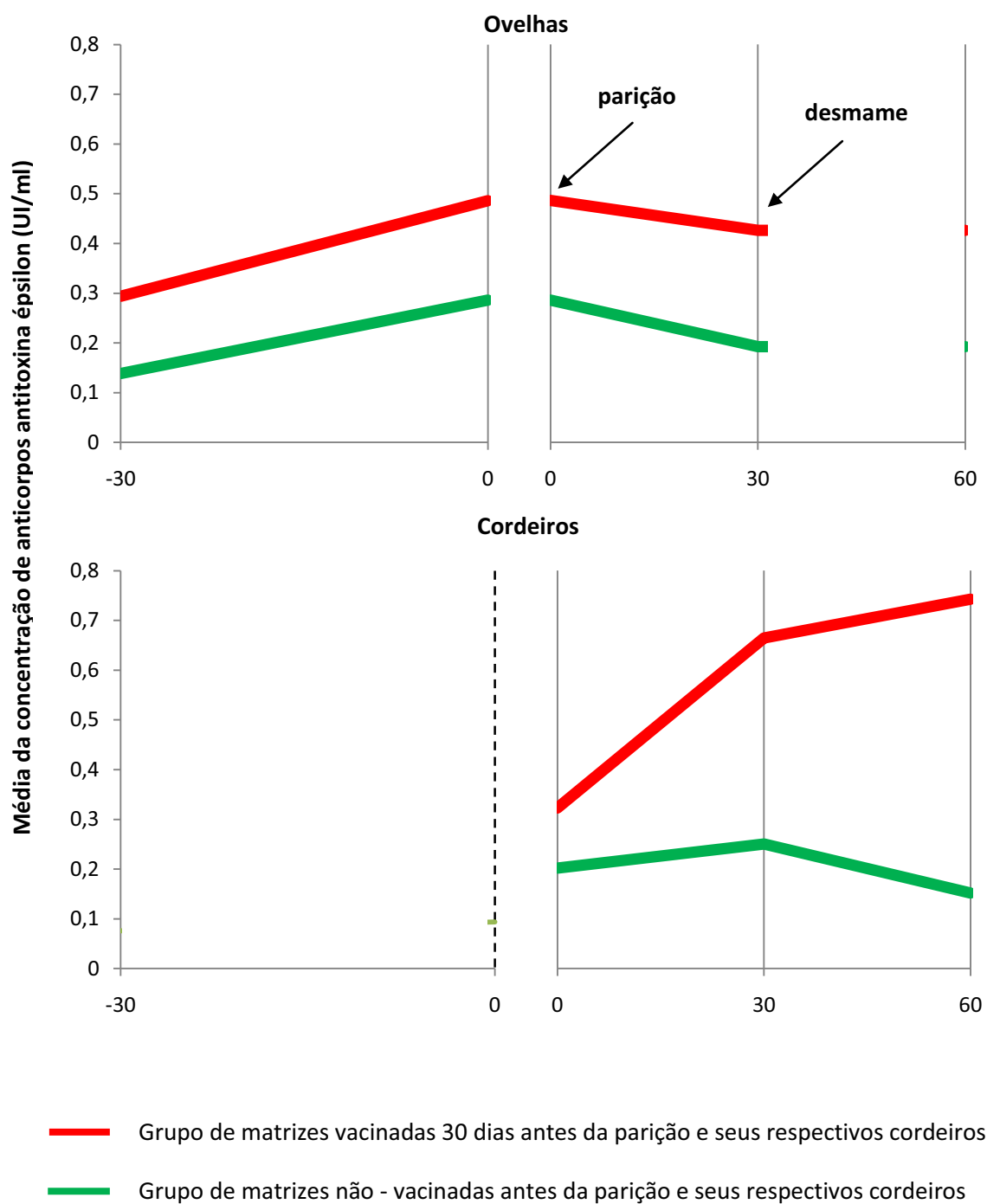


Figura 4: Média da concentração de anticorpos antitoxina épsilon em ovelhas vacinadas e não vacinadas e seus respectivos cordeiros.

APÊNDICE: Normas editoriais da revista

REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

<http://www.pvb.com.br>

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através dos e-mails <jurgen@ufrj.br> ou pvb@pvb.com.br, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF anexo). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científicas, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.;

para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) 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;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) 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 (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados 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;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

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

k) 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-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

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

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores”

(www.pvb.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; 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. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência;

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 através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) 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: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, 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 inferior da figura pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. 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 grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.