



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

RESPOSTA SOROLÓGICA EM BOVINOS VACINADOS CONTRA O CARBÚNCULO SINTOMÁTICO

Bruna Pereira Lopes

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

RESPOSTA SOROLÓGICA EM BOVINOS VACINADOS CONTRA O CARBÚNCULO SINTOMÁTICO

Bruna Pereira Lopes

Orientador: **Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Jaboticabal - SP

Agosto de 2005

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA PEREIRA LOPES – Bauru/SP, 30 de dezembro de 1977.

Graduada em Medicina Veterinária, no ano de 2002, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, câmpus de Araçatuba/SP. Iniciou a pós-graduação no ano de 2003, em Medicina Veterinária Preventiva na UNESP, câmpus de Jaboticabal/SP. Atualmente exerce a função de analista de processos de fabricação, setor de produção, no Laboratório Biovet S.A, Vargem Grande Paulista/ SP.

Dedico mais esta conquista da minha vida à minha família querida, em especial aos meus amados pais, Ana Alice e Ricardo, ao meu querido e companheiro irmão Pablo e ao meu avô do coração Oquendo Lopes, pelo amor incondicional, apoio, credibilidade e incentivo aos meus estudos e à minha carreira profissional.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, fé, determinação, bênçãos recebidas durante mais esta etapa cumprida ao longo desta caminhada e por todos os dias de minha vida.

Aos meus pais, Ricardo e Ana Alice, e ao meu irmão Pablo, pelo amor incondicional, compreensão, confiança, incentivo e admiração.

À família Victorino da Silva pelo convívio, amizade e incentivo.

A minha família de coração, Fábio Fonseca, sua esposa, Célia, e seus filhos, Juliana e João Victor, pelo amor, amizade, carinho, companheirismo, dedicação e lealdade durante esta etapa.

Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, que desde o início da graduação depositou confiança em meus trabalhos.

À minha amiga e colega de trabalho, Rosa Maria Ferreira, pela colaboração e amizade durante todo este caminho.

À professora Sílvia Perri, pela colaboração durante as análises estatísticas.

Aos meus queridos amigos e companheiros de sempre Deborah Yang, Clélia Cristina Bonetti (Cris), César Scudeller, Guilherme Vitorino, Amanda Fantini, João Paulo Araújo e Juliana Sevilha, que me acompanharam nos momentos mais difíceis e engraçados, com muita amizade e confiança.

Às amigas de jornada Thais Roberto e Renata Formaggio, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus queridos amigos de mestrado Melissa Muniz Freire, Paulo Victoria Soares e Leonel de Almeida, pelos momentos de companheirismo, choros e muitas risadas.

Às meninas da República “Respeitadas”: Adriana (Kitana), Ana Carolina (Fanta), Georgia (Caneca) e Tathiana (Bituca), que me acolheram com muito carinho durante meu percurso.

Aos funcionários da UNESP – *câmpus* Araçatuba, Adão e Pedro (Tatu) pela colaboração.

Ao Sr. Lineu Gracia e família, pela concessão dos bovinos do experimento.

Aos companheiros de trabalho na fazenda Modelo, Água Clara/ MS, Jorge, José Baptista, Rosângela, Rosalino e Filó, pela colaboração.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Agradeço também a todos aqueles que me apoiaram e me ajudaram de alguma forma para a obtenção deste título.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura.....	2
3 Objetivo.....	7
4 Material e Métodos.....	7
4.1 Organização experimental de campo.....	7
4.2 Atividades laboratoriais.....	8
4.2.1 Produção do antígeno.....	9
4.2.2 Teste de soroaglutinação rápida em placa.....	10
4.3 Análise estatística.....	12
5 Resultados.....	13
6 Discussão.....	42
7 Conclusão.....	45
8 Referências.....	46
9 Anexos.....	50
9.1 Anexo I.....	50
9.2 Anexo II.....	50

RESPOSTA SOROLÓGICA EM BOVINOS VACINADOS CONTRA O CARBÚNCULO SINTOMÁTICO

RESUMO – O *Clostridium chauvoei* é o agente causador do carbúnculo sintomático, doença que acomete bovinos e ovinos. É um dos principais problemas sanitários que ocorre nos rebanhos pecuários em todo o mundo. A vacinação dos animais jovens é a medida profilática indicada, visto que esta medida preventiva nos sistemas de produção é de extrema importância econômica e reconhecida pelos produtores, mesmo sendo de aplicação voluntária. Três grupos de bovinos, contendo 20 animais em cada grupo, foram vacinados com três vacinas comerciais contra o carbúnculo sintomático para a avaliação sorológica dos mesmos por meio do teste de aglutinação rápida em placa. Os animais foram vacinados no dia 0, e o reforço vacinal foi realizado 30 dias após a primeira dose. Após 21 dias do reforço, o sangue foi coletado da veia jugular, e o soro foi obtido a temperatura ambiente quando ocorreu a coagulação sanguínea e separação do soro. Foi comparada a resposta de indução de anticorpos nos grupos de animais reagentes a esse teste com antígenos obtidos de duas cepas, uma de referência (MT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e outra cepa de campo. Os resultados demonstraram que a resposta dos animais imunizados frente à cepa de referência foi satisfatória, não existindo diferença entre as três vacinas testadas. No entanto, quando este mesmo teste foi realizado com antígenos produzidos com a cepa de campo identificada por PCR, verificou-se a ausência de anticorpos aglutinantes na maioria dos bovinos avaliados. Na análise estatística ficou comprovado que existem diferenças significativas nos resultados dos testes de aglutinação rápida em placa quando se utilizam cepas distintas de *Clostridium chauvoei*, provavelmente em decorrência de diferenças antigênicas existentes entre as cepas.

Palavras-Chave: Bovinos, carbúnculo sintomático, *Clostridium chauvoei*, imunidade, soroaglutinação, vacinas.

SEROLOGICAL RESPONSE IN BOVINE VACCINATED AGAINST BLACK LEG

ABSTRACT – The *Clostridium chauvoei* is the agent which causes black leg, a disease that attacks the bovine and ovine. It is one of the main sanitary problems that occur with cattle-raising flocks in the world. The vaccination of young animals is the best prevention measure in production systems and is of extreme economic importance and is recognized by producers even if the application is voluntary. Three bovine groups, containing 20 animals each group, were vaccinated using three commercial vaccines against the black leg, for evaluation of bovine serological by tests of plate agglutination. The cattle were treated on day 0 and another dose was given on day 30. After 21 days, the blood was collected of jugular vein and serum was obtained at 25°C, by blood coagulation. The comparison was made by detection of antibodies response between the animals that react to the test with antigens obtained from two strains which were used, one referred (MT) as *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento* (MAPA) and another strain isolated from the field cases. The results determined that the response of the immunized animals faced by the referred strain was satisfactory with non-existing differences between the three tested vaccines. However, when the same test was conducted with antigens obtained from the field strain identified by PCR, it was verified the absence of agglutinating antibodies agglutinants in the majority of the bovines evaluated. In the statistics analysis were confirmed that significant differences were obtained in the agglutination plate test when different strains of *Clostridium chauvoei* were used, maybe because of the occurrence of antigenic difference, between the two strains tested.

KEY WORDS: Agglutination, black leg, bovine, *Clostridium chauvoei*, immunity, vaccines.

1 INTRODUÇÃO

O *Clostridium chauvoei* é uma bactéria anaeróbia, formadora de esporos, que possui um antígeno somático O termoestável e um antígeno flagelar H termolábil (BLOOD, 1983). Produz cinco toxinas solúveis, sendo uma necrótica, conhecida como alfa. Esses antígenos solúveis aumentam a patogenicidade deste microrganismo causando a doença conhecida como carbúnculo sintomático. Trata-se de uma doença infecciosa conhecida vulgarmente em nosso país por "peste da manqueira" ou "mal de ano", e nos países de língua Inglesa por "black leg", sendo seu nome científico carbúnculo sintomático.

A descoberta do agente etiológico do carbúnculo sintomático foi efetuada em 1875, por Böllinger, que publicou as diferenças entre os agentes causais do carbúnculo verdadeiro e do carbúnculo sintomático. Mais tarde, o pesquisador Fesser, publicando o resultado de suas investigações, confirmou os trabalhos de Böllinger. A evidência definitiva de que se tratava de duas doenças distintas foi dada por Arloig, Cornevin e Thomas, no ano de 1887.

As evidências demonstram que a enfermidade se desenvolve a partir da germinação de esporos latentes da bactéria e multiplicação em áreas musculares com baixo potencial de oxi-redução após terem sofrido algum processo traumático. Nessas condições, os esporos passam para a forma vegetativa e fermentam o glicogênio muscular, produzindo exotoxinas proteolíticas e resultando na formação de gases no local da lesão (STEPHEN & PIETROWISKI, 1986). A absorção dessas exotoxinas e dos metabólitos produzidos pelo *Clostridium chauvoei* leva o animal a um quadro de toxemia e morte (REBHUN et al., 1985).

A ocorrência de infecções causadas pelo *Clostridium chauvoei* foi descrita em diversos países. As espécies acometidas são principalmente os bovinos e os ovinos, podendo também afetar caprinos, suínos e eqüinos. A distribuição dos casos ocorre com mais freqüência na época das chuvas.

No Brasil, os surtos da doença acontecem em várias regiões do país e são diagnosticados clinicamente, porém existem poucos relatos publicados. Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA), são comercializadas cerca de 100 milhões de doses de vacinas por ano (BRASIL, 2003). Essa medida preventiva nos sistemas de produção de bovinos de corte e leite e ovinos é de extrema importância e reconhecida pelos produtores, mesmo sendo de aplicação voluntária.

SANTOS (2003) observou que as cobaias vacinadas contra o carbúnculo sintomático e desafiadas com uma cepa utilizada no controle oficial ficaram protegidas de maneira satisfatória, visto que 95,46% delas foram consideradas aprovadas. Por outro lado, quando foi utilizada a cepa de campo para o desafio, apenas 36,36% das vacinas foram aprovadas. Nessa condição, a maioria das vacinas comercializadas no país (63,6%) não protegeu as cobaias quando desafiadas com a cepa de campo. A portaria nº 49 normatiza e avalia todas as vacinas contra a manqueira produzidas para o mercado interno, verificando sua potência e inocuidade.

Esses resultados mais a inexistência no nosso meio de estudos sistemáticos relacionados à eficácia das vacinas comerciais em bovinos e a importância econômica e sanitária desta enfermidade na produção rural motivaram o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O *Clostridium chauvoei* é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, uma enfermidade com alto coeficiente de letalidade, e que afeta várias espécies animais, especialmente bovinos e ovinos. É uma bactéria gram-positiva, anaeróbia estrita, formadora de esporos que produz pelo menos cinco toxinas solúveis, entre elas uma hemolisina oxigênio-estável (alfa), uma Dnase (beta), uma hialuronidase (gama), hemolisina oxigênio-lábil (delta) e uma neuraminidase (RADOSTITS et al., 2002).

Os esporos são altamente resistentes às mudanças ambientais persistindo no solo por muitos anos (RADOSTITS et al., 2002). Eles duram anos quando dessecados, são destruídos por fervura em 2 a 5 minutos e resistem a fenóis,

álcool e desinfetantes à base de amônio quaternário. Lixívia e formalina são razoavelmente esporicidas (BIBERSTEIN, 1999).

O *C. chauvoei* requer um meio rico em cisteína e vitaminas hidrossolúveis para seu crescimento. As colônias são redondas e com contornos suaves, assemelhando-se às do *Clostridium septicum*, e fermenta a sacarose. A hemólise é variável (BIBERSTEIN, 1999).

As colônias apresentam formas regulares de botão de madrepérola representando o tipo IV de crescimento de Zeissler sendo as colônias como característica da espécie. Também foram observadas colônias irregulares com bordas denticuladas e superfície rugosa em ágar sangue glicosado. O *Clostridium chauvoei*, independentemente da idade das culturas e da uniformização dos meios de cultivo sólidos, apresenta as mais diferentes formas de crescimento e que a fermentação de carboidratos não é um critério preciso de diferenciação com outras espécies de clostrídios existentes no mesmo meio, sendo necessárias outras provas complementares (LIMA, 1992).

Os diversos antígenos e exsudatos celulares do *C. chauvoei*, incluindo toxinas, possuem propriedades imunogênicas e são tóxicos para cobaias. (STEVENSON & STONGER 1980). Muitas vacinas são produzidas com esses antígenos e ainda com culturas formolizadas.

Em meio ágar gema de ovo, o *C. chauvoei* promove hidrólise da gelatina e produz ácido a partir de glicose, sacarose, maltose e lactose (QUINN et al., 1994).

A estrutura antigênica do *Clostridium chauvoei* é composta de dois grupos principais: antígenos solúveis (obtidos por meio de culturas filtradas) e antígenos celulares, que podem ser subdivididos em somáticos termo-estáveis (O) e aglutinogênicos e os flagelares termo-lábeis (H) não-aglutinogênicos (MOUSSA 1959 e CRICHTON et al., 1990).

Nos bovinos a maioria dos casos ocorre em animais de seis meses a dois anos de idade, com lesões que se desenvolvem sem qualquer histórico de ferimentos embora traumatismos possam preceder alguns casos. Comumente os animais que contraem o carbúnculo sintomático se encontram em ótimo estado de

saúde, ganham peso e geralmente são os melhores animais do rebanho (CARBÚNCULO SINTOMÁTICO, 1991).

Acredita-se que a porta de entrada seja a mucosa digestiva após a ingestão de esporos presentes no solo, provavelmente na época da erupção dentária. O *Clostridium chauvoei* habita o intestino, o fígado, a musculatura lisa e esquelética e ainda outros tecidos de espécies susceptíveis e resistentes. Suspeita-se que o esforço, ferimentos e indigestão aguda sejam eventos que desencadeiam a doença (RADOSTITS et al., 2002). Acredita-se que as toxinas necrosantes e neuraminidases sejam responsáveis pelas lesões iniciais. O metabolismo bacteriano que produz gás a partir de fermentação pode contribuir para o processo. Nessas condições de crescimento microbiano e produção de toxinas, a bactéria provoca formação de lesões locais caracterizadas por edema, hemorragia e necrose miofibrilar. Os centros das lesões tornam-se ressecados, escuros, enfisematosos em razão da fermentação microbiana, enquanto a periferia fica edematosa e hemorrágica com odor rançoso (BIBERSTEIN, 1999).

Clinicamente os animais acometidos do carbúnculo sintomático apresentam claudicação, geralmente com pronunciada tumefação na região do membro afetado, com aumento de temperatura local inicialmente, tornando-se fria e indolor, apresentando também crepitação. Podem ser observadas depressão grave, anorexia, estase ruminal, temperatura em torno de 41°C e frequência de pulso elevada de 100 a 120 batimentos por minuto. A doença desenvolve-se rapidamente e o animal morre entre 12 a 36 horas após o aparecimento dos sinais. Muitos animais morrem sem ocorrência de sinais. É importante, para limitar a contaminação do solo, que as carcaças dos animais mortos sejam destruídas por combustão e enterradas profundamente (RADOSTITS et al., 2002).

O diagnóstico inicialmente é baseado nos sinais clínicos e na anamnese. A necropsia, quando da incisão da massa muscular acometida, revela tecido vermelho-escuro a negro, tumefato, com odor de ranço, contendo líquido sero-sanguinolento com presença de bolhas de gás. Histologicamente, podem ser observados mionecrose, edema, enfisema e uma celulite neutrofílica não significativa evidenciando-se os microrganismos nos cortes dos tecidos

(RADOSTITS et al., 2002). A confirmação do diagnóstico de campo pode ser feita por exame laboratorial de amostras teciduais. Estas devem ser enviadas tão logo quanto possível após a morte do animal (CARBÚNCULO SINTOMÁTICO, 1991).

A identificação deste microrganismo pode ser realizada também por alguns métodos laboratoriais. O método mais comumente utilizado é o de imunofluorescência direta, por ser rápido e relativamente barato. Possui baixa reação cruzada com outras espécies de *Clostridium* (BISPING E AMTSBERG, 1988; QUINN et al., 1994).

KUHNERT et al. (1997) utilizaram a técnica de PCR para identificação de material avaliado durante um surto de carbúnculo sintomático, que se mostrou mais eficaz quando comparada com a técnica de imunofluorescência direta.

UZAL et al. (2003) citaram uma miocardite aguda com extensas áreas multifocais de necrose coagulativa em bezerros devido à infecção pelo *Clostridium chauvoei*, confirmada pelas técnicas de imunofluorescência direta e PCR.

A doença é enzoótica em áreas específicas, principalmente quando sujeitas à inundações. Ocorre no mundo todo em taxas que diferem de região para região, o que sugere uma fonte de infecção no solo ou fatores climáticos e sazonais (BIBERSTEIN, 1999).

CLAUS & MACHEAK (1972) relataram vários problemas envolvendo o desenvolvimento de um teste de potência de bacterinas contendo *C. chauvoei*. Dentre eles destaca-se a diferença entre testes utilizando cobaias e bovinos, pois o nível de potência das vacinas é superior quando cobaias são utilizadas nos testes, e é menor quando bovinos são utilizados nos mesmos. Esse trabalho indica que a técnica de soroaglutinação em placa pode ser muito útil para medir os anticorpos circulantes, assim como para medir a habilidade relativa de animais vacinados de resistirem à infecção quando inoculados com diluições de um preparo de esporos padronizados de *C. chauvoei* para desafio. Constataram também que vacinas produzidas com culturas de cepas completas de *Clostridium chauvoei* produzem melhor imunidade em cobaias do que vacinas preparadas com lavado de células bacterianas.

MACHEAK et al. (1972) demonstraram que existe uma relação entre os títulos de aglutinação e a resposta imunológica de bovinos vacinados com bacterinas experimentais e comerciais de *C. chauvoei*. A imunidade dos bovinos vacinados e dos controles foi comprovada por meio do desafio com esporos deste mesmo microrganismo. Na maioria das vezes os surtos de carbúnculo sintomático são prevenidos pela vacinação, sendo o problema mais freqüente em rebanhos onde a vacinação foi negligenciada (BLOOD et al., 1983).

A vacina é utilizada como medida profilática em locais onde ocorre a enfermidade e o perigo de infecção persiste continuamente. As vacinas utilizadas são produzidas com bacterinas e são inativadas pelo formol. Leclainche & Vallée, 1925, elaboraram um procedimento de inoculação muito simples: fizeram um cultivo de três semanas com o *Clostridium chauvoei* em caldo de Tarozzi, inativaram-no com formalina 0,2 a 0,4% e aguardaram 24 h, considerado o prazo para que ocorresse a morte bacteriana. A vacina contém, portanto, antígenos (toxinas e produtos metabólicos das bactérias), bacilos e esporos mortos do *Clostridium chauvoei* e se conserva, sem perder a eficácia por dois anos (HUTYRA et al., 1959). A constituição da vacina é importante. A bacterina preparada de uma cepa local de *C. chauvoei* é preferida (BLOOD et al., 1983).

KERRY (1967) relatou a modificação laboratorial de cepas de *Clostridium chauvoei* quando submetidas a repetidas culturas. Animais desafiados com suspensões de esporos de cepas homólogas à vacina apresentam uma maior imunidade que quando comparados com os desafiados com cepas heterólogas.

SCHIPPER et al. (1978) demonstraram que, entre todos os fatores relevantes na indução de imunidade contra o *C. chauvoei*, o mais importante é a diferença de proteção que é dada por vacinas com cepas homólogas às do ambiente e vacinas com cepas heterólogas às encontradas no campo. Nesse mesmo trabalho, os autores constataram que bezerros filhos de vacas vacinadas possuem imunidade passiva colostrar, que dura aproximadamente três meses e pode interferir com a imunização ativa.

Quando as vacas gestantes são vacinadas contra o carbúnculo sintomático por volta do quarto mês de gestação, a imunidade passiva conferida aos bezerros confere títulos elevados até de 50 a 53 dias de vida (TROXEL et al., 1997).

Na Austrália REED E REYNOLDS (1977) relataram a ocorrência de mortes de bovinos com diagnóstico de carbúnculo sintomático sabidamente vacinados contra essa doença. A partir desses relatos, três possibilidades foram analisadas: vacina com eficiência reduzida, desafio anormal e o principal: cepa de campo ausente nas vacinas comerciais.

KNOTT et al. (1995) demonstraram que a vacinação contra doenças clostridiais foi responsável por uma significativa redução das mortes e conseqüentemente aumento nos lucros dos criadores.

SANTOS (2003) realizou testes de eficácia com vacinas comerciais contra o carbúnculo sintomático utilizando duas cepas para desafiar cobaias, uma oficial e uma cepa de campo, isolada de surto natural da doença. Após o desafio observou que 95,46% das partidas de vacinas foram aprovadas, mas quando desafiadas com a cepa de campo, somente 36,40 % foram aprovadas. Nessa condição, a maioria das vacinas comercializadas (63,6%) não protegeu as cobaias quando desafiadas com a cepa de campo. Concluiu, portanto, que a grande maioria das partidas das vacinas comerciais contra o carbúnculo sintomático testada foi considerada reprovada quando as cobaias vacinadas foram desafiadas com uma cepa de campo de *C. chauvoei*.

Nos EUA a vacinação contra o carbúnculo sintomático tem sido praticada por várias décadas, sendo considerada um manejo sanitário básico em bovinos (ROGERS & SWECKER JUNIOR, 1997).

3 OBJETIVO

Avaliar a resposta sorológica em bovinos vacinados com três vacinas comerciais polivalentes em uso no Brasil contra o carbúnculo sintomático, por meio do teste de aglutinação rápida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Organização experimental de campo

Foram utilizados 70 bezerros da raça Nelore, filhos de vacas vacinadas contra o carbúnculo sintomático, machos, com 3 meses de idade, pertencentes à Fazenda Modelo, município de Água Clara, MS, cerrado brasileiro. Previamente à vacinação, o sangue de todos os animais foi colhido por punção da veia jugular. A obtenção do soro ocorreu por coagulação natural, com os tubos em repouso e em temperatura ambiente.

Foram organizados três lotes com 20 animais cada e 10 animais ficaram como controle e não foram vacinados, sendo: 20 bovinos foram vacinados com a vacina 1, 20 bovinos com a vacina 2 e 20 bovinos com a vacina 3. Para imunização dos animais foram utilizadas três vacinas comerciais polivalentes contra o carbúnculo sintomático e adquiridas em lojas de vendas de produtos agropecuários, sendo observados os prazos de validade e conservação. Após a aquisição, os produtos foram identificados por numeração de 1 a 3, garantindo a ética experimental como condição de pesquisa.

A vacinação foi feita por via subcutânea com a dose recomendada pelo fabricante, sendo, a vacina 1 com 3 mL por bovino e as vacinas 2 e 3 com 5 mL por bovino, em dois momentos: foi aplicada uma dose no dia 0 e o reforço vacinal foi feito 30 dias após a primeira dose.

Após 21 dias da aplicação do reforço, foi colhido o sangue dos bovinos para obtenção do soro, que foi utilizado no teste de aglutinação rápida em placa.

4.2 Atividades laboratoriais

A parte laboratorial do experimento foi realizada no laboratório de enfermidades infecciosas dos animais, no departamento de apoio, produção e saúde animal, Unesp, *câmpus* de Araçatuba, SP.

Para o teste de soroaglutinação rápida em placa foram utilizados antígenos produzidos com uma cepa de campo de *C. chauvoei*, isolada de surto natural distinto, devidamente identificada pelo método de PCR (reação em cadeia de polimerase) e mantida na bacterioteca do laboratório de pesquisa em enfermidades infecciosas causadas por anaeróbios, Unesp, *câmpus* de Araçatuba, e uma outra cepa, de referência (MT), fornecida pelo MAPA.

4.2.1 Produção de antígeno

As cepas de *C. chauvoei* de referência (MT) e de campo foram cultivadas em meio de cultura descrito por CLAUS & MACHEAK (1972) e mantidas por 18h em condições de anaerobiose, a uma temperatura de 37°C. Após esse período, as culturas foram inativadas com formalina a 1% e mantidas sob refrigeração por 24h.

Para verificar a inocuidade, foram adicionados 2 mL de cada cultura ao meio thioglycolato e as culturas foram incubadas por 48h, a temperatura de 37°C, observando-se a ausência de crescimento bacteriano.

As culturas foram centrifugadas para concentração bacteriana, a 4000 rpm, durante 20 minutos, e ressuspendidas em solução de salina tamponada (CLAUS & MACHEAK, 1972). Foram padronizadas pela turbidez segundo a escala de Mac Farland, considerando o grau 3 dessa escala, com uma concentração bacteriana de 3×10^6 bactérias/ mL (BIER, 1980).

4.2.2 Teste de soroaglutinação rápida em placa

O teste de soroaglutinação rápida foi conduzido em placa de Huddleson (CLAUS & MACHEAK, 1972). Foram adicionados 50µL do antígeno de cada cepa às quantidades de 5, 10, 20 e 40µL dos soros bovinos a serem avaliados (tabela 1). A mistura foi realizada manualmente, com o auxílio de espátulas descartáveis, com movimentos circulares durante 10 minutos. As reações foram consideradas positivas quando houve completa aglutinação, ou seja, periférica e central da mistura soro e antígeno. A aglutinação apenas periférica da mistura foi considerada como reação negativa.

A leitura das reações foi efetuada com iluminação indireta da caixa de Huddleson, utilizada da mesma maneira para leitura dos testes de brucelose.

TABELA 1. Quantidade da mistura de antígeno e soro para o teste de soroaglutinação.

Antígeno	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
	+	+	+	+
Soro	40 μ L	20 μ L	10 μ L	5 μ L

Após a constatação das reações de aglutinação para os volumes de soro empregados (40, 20, 10 e 5 μ L), seguiram-se as diluições seqüenciais para cada soro. Os soros puros foram diluídos na ordem de 1:10, 1:100 e 1:1.000, para titular os anticorpos presentes.

TABELA 2. Procedimento de diluição do soro, por quantidade de soro na mistura com 50 μ L de antígeno.

Diluição do soro	Volume (μ l) de soro			
Não diluído	40	20	10	5
1/10	4	2	1	0,5
1/100	0,4	0,2	0,1	0,05
1/1000	0,04	0,02	0,01	0,005

4.3 Análise estatística

Foram utilizados dois métodos estatísticos para análise dos dados: teste exato de Fisher e teste de McNemar. O teste de Fisher é estruturado para avaliar a variação média de uma determinada fonte em relação à variação individual, e o teste de McNemar, para comparar a proporção dos animais positivos às duas cepas, antes e após a vacinação, e pela Variante Kappa, a qual indica o coeficiente de concordância entre as duas situações. Quando o valor dessa variante se aproxima de um (1) significa um maior índice de concordância. Nesse teste a análise estatística não foi realizada quando não existiu resposta imune detectada sorologicamente nos animais.

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados em tabelas de forma a comparar a resposta sorológica entre os grupos experimentais dos bovinos vacinados e do controle.

A tabela 3 mostra o perfil sorológico dos animais do grupo de controle nos dois momentos do experimento. Esses bovinos do grupo de controle apresentaram, ao longo do experimento, uma condição sorológica baixa em relação à cepa de referência e nula em relação à de campo.

TABELA 3. Número de animais reagentes no teste de aglutinação rápida em placa das amostras de soro dos bovinos do grupo de controle não vacinados (n=10) avaliados em períodos distintos (dia 0 e dia 51), utilizando cepas de referência (MT) e de campo de *C. chauvoei*

Cepas de <i>C. chauvoei</i>	volume de soro (µL)	Diluição							
		1/1		1/10		1/100		1/1000	
		0*	51	0	51	0	51	0	51
Referência (MT)	40	3	3	3	3	3	3	0	0
	20	3	3	3	3	3	3	0	0
	10	2	2	2	2	2	2	0	0
	5	1	1	1	1	1	1	0	0
Cepa de campo	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 o período após a vacinação.

As figuras 1 e 2 representam o número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa antes da vacinação (dia 0), quando analisados com a cepa de referência e com a cepa de campo, respectivamente, em relação ao grupo de controle e aos três grupos dos bovinos vacinados e revacinados.

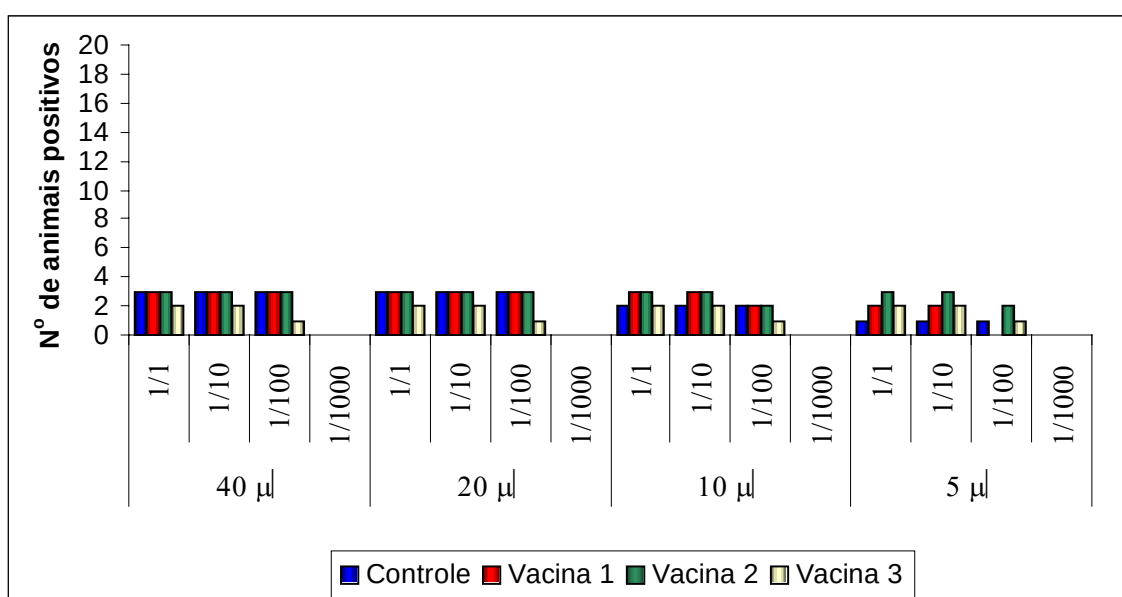


Figura 1. Representação gráfica do número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa antes da vacinação, quando analisados com a cepa de referência (MT), para todos os grupos avaliados.

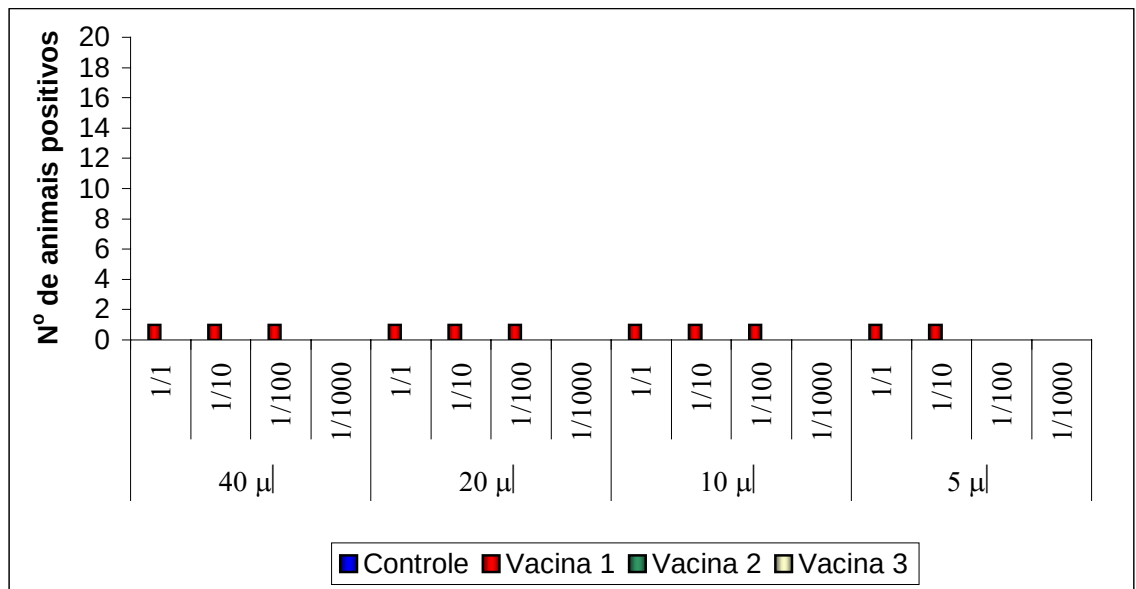


Figura 2. Representação gráfica do número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa antes da vacinação, quando analisados com a cepa de campo, para todos os grupos avaliados.

As figuras 3 e 4 representam o número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa após a vacinação e reforço vacinal, quando analisados frente às mesmas cepas.

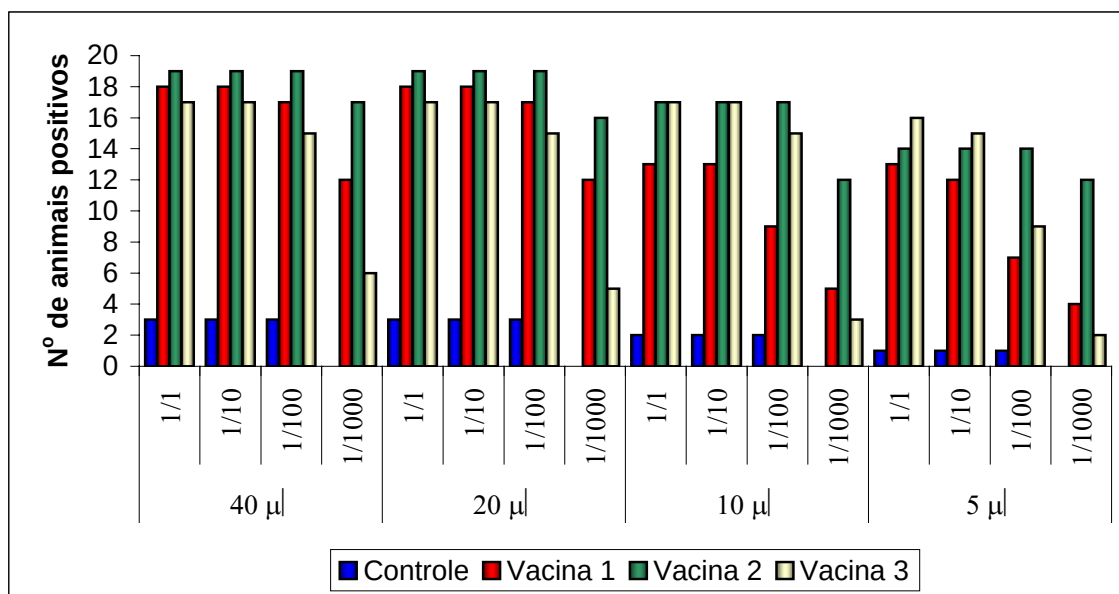


Figura 3. Representação gráfica do número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa após a vacinação e reforço vacinal, quando analisados com a cepa de referência (MT), para todos os grupos avaliados.

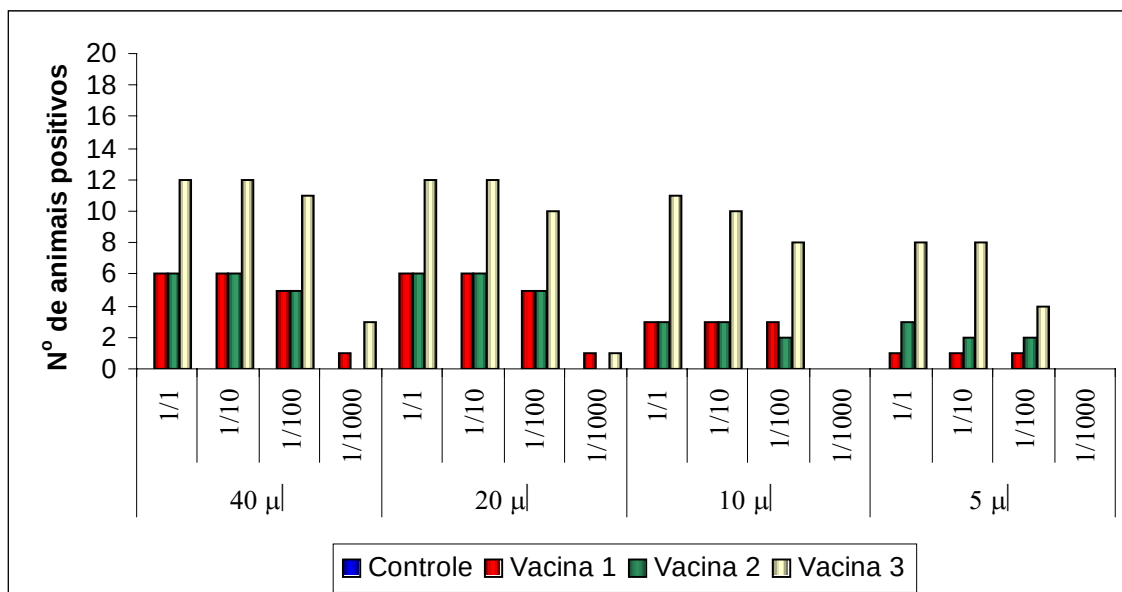


Figura 4. Representação gráfica do número de bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação em placa após a vacinação, quando analisados com a cepa de campo, para todos os grupos avaliados.

As tabelas de 4 a 6 apresentam o número de bovinos que responderam positivamente à vacinação realizada com as três vacinas comerciais utilizadas nesse estudo. Conforme essas tabelas, o número de animais reagentes imunizados com as três vacinas testadas demonstrou que estes apresentaram uma expressiva resposta imunológica frente à cepa de referência (MT), presente nas vacinas, e uma baixa resposta em relação à cepa de campo. Contudo, observou-se uma resposta sorológica mais eficaz da vacina de número 3 em relação à cepa de campo.

TABELA 4. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 1, antes (dia 0) e após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Cepa	Volume de soro (µL)	Diluição							
		1/1		1/10		1/100		1/1000	
		0*	51	0	51	0	51	0	51
Referência (MT)	40	3	18	3	18	3	17	0	12
	20	3	18	3	18	3	17	0	12
	10	3	13	3	13	2	9	0	5
	5	2	13	2	12	0	7	0	4
Cepa de campo	40	1	6	1	6	1	5	0	1
	20	1	6	1	6	1	5	0	1
	10	1	3	1	3	0	3	0	0
	5	1	1	1	1	0	1	0	0

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 é o período após a vacinação.

TABELA 5. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 2, antes (dia 0) e após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Cepa	Volume de soro (μL)	Diluição							
		1/1		1/10		1/100		1/1000	
		0*	51	0	51	0	51	0	51
Referência (MT)	40	3	19	3	19	3	19	0	17
	20	3	19	3	19	3	19	0	16
	10	3	17	3	17	2	17	0	12
	5	3	14	3	14	2	14	0	12
Cepa de campo	40	0	6	0	6	0	5	0	0
	20	0	6	0	6	0	5	0	0
	10	0	3	0	3	0	2	0	0
	5	0	3	0	2	0	2	0	0

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 é o período após a vacinação.

TABELA 6. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 3, antes (dia 0) e após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Cepa	Volume de soro (µL)	Diluição							
		1/1		1/10		1/100		1/1000	
		0*	51	0	51	0	51	0	51
Referência (MT)	40	2	17	2	17	1	15	0	6
	20	2	17	2	17	1	15	0	5
	10	2	17	2	17	1	15	0	3
	5	2	16	2	15	1	9	0	2
Cepa de campo	40	0	12	0	12	0	11	0	3
	20	0	12	0	12	0	10	0	1
	10	0	11	0	10	0	8	0	0
	5	0	8	0	8	0	4	0	0

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 é o período após a vacinação.

As tabelas 7 e 8 apresentam a análise estatística utilizando o teste exato de Fisher ($P < 0,05$), com o objetivo de comparar o número de animais reagentes para as cepas de referência (MT) (tab. 7) e de campo (tab. 8), dos grupos de controle, vacinas 1, 2 e 3 nas diferentes quantidades de soro e suas respectivas diluições. A comparação das tabelas 7 e 8 por meio do teste exato de Fisher demonstra que os três grupos dos bovinos avaliados na situação pré-vacinação não tiveram diferenças significativas entre eles e em relação ao grupo de controle.

Na análise da etapa após a revacinação (tab. 7) houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos dos animais vacinados, que responderam positivamente ao teste de soroaglutinação rápida em placa com o antígeno (cepa de referência – MT), e o grupo de controle. Nessa mesma análise estatística

referente à cepa de campo (tab. 8) na situação prévia à vacinação, a comparação entre os quatro grupos de animais não demonstrou variação estatística significativa ($P < 0,05$). Quando comparou-se na etapa pós-vacinação os grupos de bovinos vacinados em relação ao grupo de controle, verificou-se uma baixa resposta dos grupos dos animais vacinados com as vacinas 1 e 2 e uma melhor resposta imune do grupo que recebeu a vacina 3. O teste exato de Fisher demonstrou uma diferença significativa na maioria das diluições realizadas no teste de soroaglutinação rápida em placa.

TABELA 7. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=70) de bovinos do grupo de controle e dos grupos vacinados com as vacinas 1, 2 e 3, reagentes para a cepa de referência (MT), antes (dia 0) e após a vacinação e reforço vacinal (dia 51) por volume de soro e diluição

Volume de soro (µL)	Diluição	Controle (n = 10)		Vacina 1 (n = 20)		Vacina 2 (n = 20)		Vacina 3 (n = 20)		P**	
		0*	51	0	51	0	51	0	51	0	51
40	1/1	3	3	3	18	3	19	2	17	0,5960	0,0003
	1/10	3	3	3	18	3	19	2	17	0,5960	0,0003
	1/100	3	3	3	17	3	19	1	15	0,2844	0,0014
	1/1000	0	0	0	12	0	17	0	6	----	<0,0001
20	1/1	3	3	3	18	3	19	2	17	0,5960	0,0003
	1/10	3	3	3	18	3	19	2	17	0,5960	0,0003
	1/100	3	3	3	17	3	19	1	15	0,2844	0,0014
	1/1000	0	0	0	12	0	16	0	5	----	<0,0001
10	1/1	2	2	3	13	3	17	2	17	0,9627	0,0016
	1/10	2	2	3	13	3	17	2	17	0,9627	0,0016
	1/100	2	2	2	9	2	17	1	15	0,6230	0,0014
	1/1000	0	0	0	5	0	12	0	3	----	0,0014
5	1/1	1	1	2	13	3	14	2	16	1,0000	0,0021
	1/10	1	1	2	12	3	14	2	15	1,0000	0,0051
	1/100	1	1	0	7	2	14	1	9	0,6641	0,0137
	1/1000	0	0	0	4	0	12	0	2	----	0,0003

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 o período após a vacinação.

** P = nível descritivo do teste exato de Fisher.

TABELA 8. Número de animais reagentes ao teste de soroaglutinação em placa das amostras (n=70) de bovinos do grupo de controle e dos grupos vacinados com as vacinas 1, 2 e 3, reagentes para a cepa de campo, nos dois momentos do experimento, antes (dia 0) e após a vacinação e reforço vacinal (dia 51), por volume de soro e diluição

Volume de soro (μ L)	Diluição	Controle (n = 10)		Vacina1 (n = 20)		Vacina 2 (n = 20)		Vacina 3 (n = 20)		P**	
		0*	51	0	51	0	51	0	51	0	51
40	1/1	0	0	1	6	0	6	0	12	1,0000	0,0081
	1/10	0	0	1	6	0	6	0	12	1,0000	0,0081
	1/100	0	0	1	5	0	5	0	11	1,0000	0,0127
	1/1000	0	0	0	1	0	0	0	3	----	0,2973
20	1/1	0	0	1	6	0	6	0	12	1,0000	0,0081
	1/10	0	0	1	6	0	6	0	12	1,0000	0,0081
	1/100	0	0	1	5	0	5	0	10	1,0000	0,0355
	1/1000	0	0	0	1	0	0	0	1	----	1,0000
10	1/1	0	0	1	3	0	3	0	11	1,0000	0,0025
	1/10	0	0	1	3	0	3	0	10	1,0000	0,0089
	1/100	0	0	1	3	0	2	0	8	1,0000	0,0378
	1/1000	0	0	0	0	0	0	0	0	----	----
5	1/1	0	0	1	1	0	3	0	8	1,0000	0,0112
	1/10	0	0	1	1	0	2	0	8	1,0000	0,0069
	1/100	0	0	0	1	0	2	0	4	----	0,3768
	1/1000	0	0	0	0	0	0	0	0	----	----

*Avaliação sorológica em momentos distintos, correspondentes aos períodos dos grupos vacinados, onde 0 é o período que antecede à vacinação e 51 é o período após a vacinação.

** P = nível descritivo do teste exato de Fisher.

As tabelas de 9 a 16 comparam o número de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em relação aos reagentes para a cepa de campo. Nesta comparação foi utilizado o teste estatístico de McNemar. Essas tabelas indicam a proporção de bovinos positivos para a cepa de referência (MT) em comparação ao número de animais positivos para a cepa de campo, por meio do teste estatístico de McNemar ($P < 0,05$). Nas tabelas 9, 11, 13 e 15, a variante Kappa apresenta concordância alta, pois a comparação entre os resultados realizados por meio dos

testes de soroaglutinação rápida em placa com as cepas de referência (MT) e de campo foi obtida antes da vacinação. A variante Kappa indica o coeficiente de concordância entre as duas cepas testadas. Essa concordância é considerada alta quando o valor do Kappa se aproxima de um (1).

Diferentemente das tabelas 10, 12, 14 e 16 que apresentam concordância baixa, pois a comparação entre os bovinos testados frente às cepas de referência (MT) e de campo, foi feita após a etapa de vacinação, indicando uma resposta imune eficaz. Utilizando este mesmo teste para as tabelas de 17 a 20, foi feita uma comparação com a cepa de referência (MT) das situações antes e após a vacinação com o objetivo de avaliar o grau de concordância entre as mesmas. As tabelas 17 a 20 demonstram a comparação entre a resposta imunológica dos animais testados frente à cepa de referência (MT) por meio do teste de soroaglutinação rápida em placa, nos dois momentos do experimento no grupo de controle e antes e depois da vacinação dos três grupos de animais vacinados e revacinados. O valor da variante Kappa no grupo dos animais de controle (tab. 17), é máximo (1). Isto demonstra que os dois momentos do experimento concordam entre si.

Nas tabelas 18, 19 e 20 os bovinos dos grupos vacinados com as vacinas 1, 2 e 3 desenvolveram resposta sorológica satisfatória quando testados frente à cepa de referência (MT). Para os três grupos de animais imunizados e avaliados com as respectivas vacinas, o coeficiente de concordância (Kappa) apresentou valor baixo, demonstrando que existe pouca concordância nos dois momentos analisados: antes e depois da vacinação e do reforço vacinal (dias 0 e 51, respectivamente).

Do mesmo modo, esse teste foi realizado novamente nas tabelas de 21 a 24 para a cepa de campo. Observou-se que nos grupos dos bovinos de controle e nos grupos vacinados com as respectivas vacinas 1, 2 e 3, o valor da variante Kappa se manteve nulo ou baixo, expressando alta concordância entre as respostas sorológicas dos grupos.

TABELA 9. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=10) de bovinos do grupo de controle indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação aos animais reagentes à cepa de campo, antes da vacinação (dia 0)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 10. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=10) de bovinos do grupo de controle indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (µL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	7		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	8		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	9		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 11. Número de animais reagentes ao teste de soroaglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 1, indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, antes da vacinação (dia 0)

Volume de soro (µL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/10	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/100	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----
20	1/1	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/10	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/100	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----
10	1/1	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/10	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/100	Positivo Negativo	0 2	0 18	----	----
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	1 1	0 18	0,3173	0,6429
	1/10	Positivo Negativo	1 1	0 18	0,3173	0,6429
	1/100	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 12. Número de animais reagentes ao teste de soroaglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 1 indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	6	0	0,0005	0,0909
		Negativo	12	2		
	1/10	Positivo	6	0	0,0005	0,0909
		Negativo	12	2		
	1/100	Positivo	5	0	0,0005	0,1111
		Negativo	12	3		
	1/1000	Positivo	1	0	0,0009	0,0678
		Negativo	11	8		
20	1/1	Positivo	6	0	0,0005	0,0909
		Negativo	12	2		
	1/10	Positivo	0	6	0,0005	0,0909
		Negativo	12	2		
	1/100	Positivo	5	0	0,0005	0,1111
		Negativo	12	3		
	1/1000	Positivo	1	0	0,0009	0,0678
		Negativo	11	8		
10	1/1	Positivo	3	0	0,0016	0,1736
		Negativo	10	7		
	1/10	Positivo	3	0	0,0016	0,1736
		Negativo	10	7		
	1/100	Positivo	3	1	0,0339	0,1398
		Negativo	7	10		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	5	15		
5	1/1	Positivo	1	0	0,0005	0,0551
		Negativo	12	7		
	1/10	Positivo	1	0	0,0009	0,0678
		Negativo	11	8		
	1/100	Positivo	1	0	0,0143	0,1781
		Negativo	6	13		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	4	16		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 13. Número de animais reagentes ao teste de soroaglutinação em placa das amostras (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 2 indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, antes da vacinação (dia 0)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 14. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 2, indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	6	0	0,0003	0,0441
		Negativo	13	1		
	1/10	Positivo	6	0	0,0003	0,0441
		Negativo	13	1		
	1/100	Positivo	5	0	0,0002	0,0345
		Negativo	14	1		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	17	3		
20	1/1	Positivo	6	0	0,0003	0,0441
		Negativo	13	1		
	1/10	Positivo	6	0	0,0003	0,0441
		Negativo	13	1		
	1/100	Positivo	5	0	0,0002	0,0345
		Negativo	14	1		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	16	4		
10	1/1	Positivo	3	0	0,0002	0,0604
		Negativo	14	3		
	1/10	Positivo	3	0	0,0002	0,0604
		Negativo	14	3		
	1/100	Positivo	2	0	0,0001	0,0385
		Negativo	15	3		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
5	1/1	Positivo	3	0	0,0009	0,1406
		Negativo	11	6		
	1/10	Positivo	2	0	0,0005	0,0909
		Negativo	12	6		
	1/100	Positivo	2	0	0,0005	0,0909
		Negativo	12	6		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 15. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 3, indicando a proporção de animais positivos para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, antes da vacinação (dia 0)

Volume de soro (µL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	19	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	19	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	19	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18	-----	-----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	19	-----	-----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20	-----	-----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 16. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 3, indicando a proporção de animais reagentes para a cepa de referência (MT) em comparação com a cepa de campo, após a vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo	Referência (MT)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	12 5	0 3	0,0253	0,4186*
	1/10	Positivo Negativo	12 5	0 3	0,0253	0,4186*
	1/100	Positivo Negativo	9 6	2 3	0,1573	0,1579
	1/1000	Positivo Negativo	2 4	1 13	0,1797	0,3056
20	1/1	Positivo Negativo	12 5	0 3	0,0253	0,4186*
	1/10	Positivo Negativo	12 5	0 3	0,0253	0,4186*
	1/100	Positivo Negativo	8 7	2 3	0,0956	0,1000
	1/1000	Positivo Negativo	0 5	1 14	0,1025	0,0909
10	1/1	Positivo Negativo	11 6	0 3	0,0143	0,3548
	1/10	Positivo Negativo	10 7	0 3	0,0082	0,3000
	1/100	Positivo Negativo	6 9	2 3	0,0348	0,0000
	1/1000	Positivo Negativo	0 3	0 17	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	7 9	1 3	0,0114	0,1071
	1/10	Positivo Negativo	6 9	2 3	0,0348	0,0000
	1/100	Positivo Negativo	4 5	0 11	0,0253	0,4186*
	1/1000	Positivo Negativo	0 2	0 18	----	----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 17. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=10) de bovinos do grupo de controle, comparando a resposta sorológica frente à cepa de referência (MT) antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (µL)	Diluição	Referência (MT) – Antes (dia 0)	Referência (MT) – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/10	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/100	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 10	----	----
20	1/1	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/10	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/100	Positivo Negativo	3 0	0 7	----	1,0000
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 10	----	----
10	1/1	Positivo Negativo	2 0	0 8	----	1,0000
	1/10	Positivo Negativo	2 0	0 8	----	1,0000
	1/100	Positivo Negativo	2 0	0 8	----	1,0000
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 10	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	1 0	0 9	----	1,0000
	1/10	Positivo Negativo	1 0	0 9	----	1,0000
	1/100	Positivo Negativo	1 0	0 9	----	1,0000
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 10	----	----

P = nível descritivo de MacNemar.

TABELA 18. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 1, comparando a resposta sorológica frente à cepa de referência (MT) antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Referência (MT) Antes (dia 0)	Referência (MT) Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	3	0	0,0001	0,0385
		Negativo	15	2		
	1/10	Positivo	3	0	0,0001	0,0385
		Negativo	15	2		
	1/100	Positivo	3	0	0,0002	0,0604
		Negativo	14	3		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
20	1/1	Positivo	3	0	0,0001	0,0385
		Negativo	15	2		
	1/10	Positivo	3	0	0,0001	0,0385
		Negativo	15	2		
	1/100	Positivo	3	0	0,0002	0,0604
		Negativo	14	3		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
10	1/1	Positivo	3	0	0,0016	0,1736
		Negativo	10	7		
	1/10	Positivo	3	0	0,0016	0,1736
		Negativo	10	7		
	1/100	Positivo	1	1	0,0196	0,0217
		Negativo	8	10		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	5	15		
5	1/1	Positivo	2	0	0,0009	0,1129
		Negativo	11	7		
	1/10	Positivo	2	0	0,0016	0,1379
		Negativo	10	8		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	7	13		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	6	14		

TABELA 19. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 2, comparando a resposta sorológica frente à cepa de referência (MT) antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (µL)	Diluição	Referência (MT) – Antes (dia 0)	Referência (MT) – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/10	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/100	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/1000	Positivo Negativo	0 17	0 3	----	----
20	1/1	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/10	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/100	Positivo Negativo	3 16	0 1	<0,0001	0,0184
	1/1000	Positivo Negativo	0 16	0 4	----	----
10	1/1	Positivo Negativo	3 14	0 3	0,0002	0,0604
	1/10	Positivo Negativo	3 14	0 3	0,0002	0,0604
	1/100	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/1000	Positivo Negativo	0 12	0 8	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	3 11	0 6	0,0009	0,1406
	1/10	Positivo Negativo	3 11	0 6	0,0009	0,1406
	1/100	Positivo Negativo	2 12	0 6	0,0005	0,0909
	1/1000	Positivo Negativo	0 12	0 8	----	----

TABELA 20. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 3, comparando a resposta sorológica frente à cepa de referência (MT) antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (µL)	Diluição	Referência (MT) – Antes (dia 0)	Referência (MT) – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/10	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/100	Positivo Negativo	1 14	0 5	0,0002	0,0345
	1/1000	Positivo Negativo	0 6	0 14	----	----
20	1/1	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/10	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/100	Positivo Negativo	1 14	0 5	0,0002	0,0345
	1/1000	Positivo Negativo	0 5	0 15	----	----
10	1/1	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/10	Positivo Negativo	2 15	0 3	0,0001	0,0385
	1/100	Positivo Negativo	1 14	0 5	0,0002	0,0345
	1/1000	Positivo Negativo	0 3	0 17	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	2 14	0 4	0,0002	0,0541
	1/10	Positivo Negativo	2 13	0 5	0,0003	0,0714
	1/100	Positivo Negativo	1 8	0 11	0,0047	0,1209
	1/1000	Positivo Negativo	0 2	0 18	----	----

TABELA 21. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=10) de bovinos do grupo de controle comparando a resposta sorológica frente à cepa de campo, antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo – Antes (dia 0)	Cepa de campo – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	10	----	----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 22. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 1, comparando a resposta sorológica frente à cepa de campo, antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço (dia 51)

Volume de soro (µL)	Diluição	Cepa de campo –Antes (dia 0)	Cepa de campo – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo Negativo	1 5	0 14	0,0253	0,2187
	1/10	Positivo Negativo	1 5	0 14	0,0253	0,2187
	1/100	Positivo Negativo	1 4	0 15	0,0455	0,2727
	1/1000	Positivo Negativo	0 1	0 19	----	----
20	1/1	Positivo Negativo	1 5	0 14	0,0253	0,2187
	1/10	Positivo Negativo	1 5	0 14	0,0253	0,2187
	1/100	Positivo Negativo	1 4	0 15	0,0455	0,2727
	1/1000	Positivo Negativo	0 1	0 19	----	----
10	1/1	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/10	Positivo Negativo	1 2	0 17	0,1573	0,4595
	1/100	Positivo Negativo	0 3	0 17	----	----
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----
5	1/1	Positivo Negativo	0 1	1 18	1,0000	0,0526
	1/10	Positivo Negativo	0 1	1 18	1,0000	0,0526
	1/100	Positivo Negativo	0 1	0 19	----	----
	1/1000	Positivo Negativo	0 0	0 20	----	----

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 23. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados e com a vacina 2, comparando a resposta sorológica frente à cepa de campo, antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μ L)	Diluição	Cepa de campo – Antes (dia 0)	Cepa de campo – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	6	14		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	6	14		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	5	15		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	6	14		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	6	14		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	5	15		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	2	18		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

TABELA 24. Número de animais reagentes ao teste de aglutinação em placa das amostras de soro (n=20) do grupo de bovinos vacinados com a vacina 3, comparando a resposta sorológica frente à cepa de campo, antes (dia 0) e depois da vacinação e reforço vacinal (dia 51)

Volume de soro (μL)	Diluição	Cepa de campo – Antes (dia 0)	Cepa de campo – Depois (dia 51)		P	Kappa
			Positivo	Negativo		
40	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	11	9		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	3	17		
20	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	12	8		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	10	10		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	1	19		
10	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	11	9		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	10	10		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	8	12		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		
5	1/1	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	8	12		
	1/10	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	8	12		
	1/100	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	4	16		
	1/1000	Positivo	0	0	----	----
		Negativo	0	20		

P = nível descritivo do teste de McNemar.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi feita a comparação da resposta sorológica por meio do teste de soroaglutinação rápida em placa, de bovinos vacinados com três vacinas comerciais e polivalentes contra o carbúnculo sintomático em uso no Brasil, empregando duas cepas: uma de referência (MT) e uma cepa de campo. MACHEAK et al. (1972) demonstraram que existe uma relação entre os títulos de aglutinação e a resposta imunológica de bovinos vacinados com bacterinas experimentais e comerciais de *Clostridium chauvoei*.

A técnica de soroaglutinação rápida em placa pode ser muito útil para medir os anticorpos, assim como para medir a habilidade relativa de animais vacinados de resistirem à infecção quando inoculados com diluições de um preparo de esporos padronizados de *C. chauvoei* para desafio (CLAUS & MACHEAK, 1972).

O princípio do teste de soroaglutinação consiste na ligação do antígeno com o anticorpo e que se realiza pela formação de múltiplas ligações não covalentes entre o antígeno e os epítomos do local de união. Embora as forças de atração (pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, Van der Waals e hidrofóbicas) envolvidas nestas uniões sejam individualmente fracas em comparação com as ligações covalentes, a maior quantidade possível de ligações leva a uma considerável força de coesão. As ligações não covalentes são criticamente dependentes da distância entre os grupos reagentes (TIZARD, 2002).

Frente aos resultados apresentados nas tabelas 3 e 4 (grupo de controle), os bovinos reagentes ao teste de soroaglutinação rápida podem ter ocorrido devido às mães desses bezerros terem sido vacinadas contra o carbúnculo sintomático.

Bezerros filhos de vacas vacinadas possuem imunidade passiva colostrar, que dura aproximadamente três meses e pode interferir com a imunização ativa (SCHIPPER et al., 1978). O pico dos níveis de imunoglobulinas no soro é normalmente alcançado entre 12 e 24 h após o nascimento. Após o término da absorção, esses anticorpos adquiridos passivamente declinam por meio de processos catabólicos normais (TIZARD, 2002). A taxa de redução varia entre as

diferentes classes de imunoglobulinas e o tempo necessário para o declínio a níveis não protetores depende de sua concentração inicial (HEBERT, 1972).

Da totalidade dos bovinos vacinados neste estudo, alguns animais não reagiram ao teste de soroaglutinação, mesmo recebendo uma dose adequada de uma vacina e seu reforço. **Comumente, o animal pode falhar em desenvolver uma resposta imunológica.** Existem muitas razões pelas quais uma vacina pode não conferir imunidade a um animal: se for realizada uma administração correta, o animal pode responder ou não. No caso do animal responder podem ocorrer alguns problemas, tais como: vacina dada muito tarde com o animal já infectado, cepa ou organismo errado ou antígenos não protetores; no caso dos animais que não respondem, podem ter ocorrido os seguintes problemas: interferência com imunidade passiva, animal imunossuprimido, variação biológica ou vacina inadequada. No caso de ocorrer uma administração incorreta, os possíveis problemas seriam a via de administração inapropriada, morte da vacina (caso das vacinas vivas) ou se administradas a animais passivamente protegidos (TIZARD, 2002).

Em alguns casos, a vacina pode na verdade ser ineficiente na proteção. **Isso poderia acontecer pelas vacinas conterem cepa errada do organismo ou antígenos errados.** A resposta imune, por ser um processo biológico, nunca confere uma proteção absoluta e nunca é equivalente em todos os membros de uma população vacinada. Como a resposta imune é influenciada por um grande número de fatores genéticos ambientais, a variação de respostas imunes em uma grande população de animais tende a seguir uma distribuição normal. Isso significa que a maioria dos animais responde aos antígenos por meio de uma resposta imunomediada, na qual alguns montarão uma resposta excelente, mas uma pequena proporção montará uma resposta imune muito fraca. O grupo dos maus respondedores pode não ser protegido contra uma infecção, apesar de ter recebido doses de vacinas adequadamente. Portanto, é impossível garantir 100% de proteção em uma população de animais aleatória, por meio de uma vacinação (TIZARD, 2002).

Os resultados expressos nas tabelas de 4 a 6 representam o número de bovinos que responderam sorologicamente à vacinação e ao reforço vacinal realizadas com as três vacinas comerciais analisadas. Os dados apresentados nessas tabelas demonstraram que os animais apresentaram uma resposta sorológica expressiva em relação à cepa de referência (MT), presente nas vacinas. Contudo, somente observou-se uma resposta sorológica mais eficaz da vacina de número 3 em relação à cepa de campo. Esses resultados em maior ou menor proporção frente a essa cepa podem ser devido à existência de diferenças antigênicas entre as cepas (TROXEL, 1997).

Entre todos os fatores relevantes na indução de imunidade contra o *Clostridium chauvoei*, o mais importante é a diferença de proteção que é dada por vacinas com cepas homólogas às do ambiente e por vacinas com cepas heterólogas às encontradas no campo (SCHIPPER, 1978).

A possibilidade mais evidenciada no presente estudo foram as diferenças significativas no teste de soroaglutinação rápida em placa quando se utiliza cepas distintas de *Clostridium chauvoei*, confirmando a ocorrência de diferenças antigênicas entre as cepas. Sabe-se que a vacinação com cepas homólogas protege melhor contra desafio homólogo que contra desafio heterólogo, pois algumas cepas produzem imunidade com maior espectro de proteção que outras. Deve-se relatar ainda, o fato de algumas cepas parecerem altamente virulentas, devendo-se isso provavelmente ao fato de que vacinas produzidas com cepas laboratoriais que foram submetidas a repetidas subculturas perdem seus antígenos e assim modificam-se substancialmente, não conferindo mais a proteção adequada (KERRY, 1967).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados de avaliação da resposta sorológica em bovinos vacinados com três vacinas comerciais polivalentes contra o carbúnculo sintomático, avaliada pelo teste de soroaglutinação rápida e utilizando-se de duas cepas distintas de *Clostridium chauvoei*, pode-se concluir que:

- Existem diferenças antigênicas entre as cepas de referência (MT) e de campo.
- A resposta sorológica dos grupos de bovinos vacinados contra o carbúnculo sintomático foi satisfatória quando foi utilizada a cepa de referência (MT) nos testes de aglutinação rápida, não existindo diferenças estatísticas entre as três vacinas testadas.
- Apenas uma das três vacinas testadas desencadeou a formação de anticorpos aglutinantes na maioria dos bovinos do grupo, quando os mesmos foram avaliados com a cepa de campo.

8 REFERÊNCIAS*

BIBERSTEIN, E.L. Os clostrídios. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.223-224.

BIER, O. Técnicas Bacteriológicas. In: _____ **Microbiologia e Imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980. p.931.

BISPING, W.; AMTSBERG, G. **Color atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals**. Berlim: Paul Parey, 1988. 339 p.

BLOOD, D.C. et al. Doenças causadas por bactérias II. In: _____ **Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 430-432.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 01, de 15 de janeiro de 2003. **Diário oficial de Brasília**, Brasília, n.70, p.10-13, 2003. Seção 01.

CARBUNCULO sintomático. In: MANUAL Merck de veterinária. 6.ed. São Paulo: Rocca, 1991. p.1803.

CLAUS, K.D; MACHEAK, M.E. Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. **Am. J. Vet. Rev.**, Chicago, v. 33, n.5, p.1045-1052, May 1972.

CLAUS, K.D; MACHEAK, M.E. Characteristics and immunizing properties of culture filtrates of *Clostridium chauvoei*. **Am. J. Vet. Rev.**, Chicago, v.33, n.5, p.1031-1038, May 1972.

* As referências foram citadas de acordo com as normas da ABNT, 2003.

CRICHTON, R.; SOLOMON, J.; BARTON, A.M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens. **Biologicals**, London, v.18, n.1, p.49-54, Jan.1990.

GANDOLFI, W. Doenças causadas por bactérias II. In: BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p.430-432.

HEBERT, W.J. Imunidade passiva. In: HEBERT, W.J. **Inmunología Veterinaria**. Zaragoza, Editorial Acubia, 1972. p. 287.

HENDERSON, D. W. Studies on *Clostridium chauvoei*. In: the analysis of the "H" and "O" antigens of *Clostridium chauvoei*. **Carn. res. fel.**, London, v.1, p.412-420, Aug.1932.

HUTYRA, F.V.; MAREK, J.; MANNINGER, R. Enfermidades com edemas gasosos. In: _____. **Patología y terapéutica especiales de los animales domesticos**. Barcelona: Editorial Labor, 1959. p. 48.

KERRY, J.B. Immunological differences between strains of *Clostridium chauvoei*. **Res. Vet. Sci.**, Oxford, v.8, n.1, p.89-97, Jan.1967.

KNOTT, G.K.L.; ERWIN, B.G.; CLASSICK, L.G. Benefits of a clostridial vaccination program in feedlot cattle. **Vet. Med.**, Kansas, v.80, n.6, p.95-97, June1995.

KUHNERT, P. et al. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.57, n.2/3, p. 291-298, Sept. 1997.

LIMA, F.G.F. Tipos de colônia e características bioquímicas de cultura de *Clostridium chauvoei* isolados de bovinos no Brasil. **Pesqu. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.12, n.3/4, p.65-69, Jul./Dez. 1992.

MACHEAK, M.E. et al. Potency testing clostridium chauvoei-containing bacterins: relationship of agglutination titers and potency tests in cattle. *Am. J. Vet. Rev.*, Chicago, v. 33, n.5, p.1053-1058, May 1972.

MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. **J. Pathol. Bacteriol.**, London, v.77, n. 2, p.341-350, Apr.1959.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. p.648.

RADOSTITS, O.M. et al. Doenças causadas por bactérias II. In: _____ **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REBHUN, W.C. et al. Malignant edema in horses. **J. Am. Vet. Assoc.**, Chicago, v.187, n.7, p.732-736, Oct.1985.

REED, G.A.; REYNOLDS, L. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. **Aust. Vet. J.**, Sydney, v.53, n.8, p.393, Aug. 1977.

ROGERS, G.M.; SWECKER JUNIOR, W.S. Clostridial vaccines: timing and quality assurance. **Compend. Conten. Educ. Pract. Vet.**, Princeton, v.19, sup., p.5278-5285, Oct.1997.

SANTOS, B.A. **Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra o carbúnculo sintomático em uso no Brasil.** 2003. 35f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

SCHIPPER, I.A. et al. Effects of passive immunity on immune response in calves vaccinated against *Clostridium chauvoei* infection (blackleg). **Vet. Med./ Small Anim. Clin.**, Edwardsville, v.73, n.12, p.1564-1566, Dec.1978.

STEPHEN, J.; PIETROWISKI, R.A. Bacterial toxins. 2.ed. Washington: **American Society for Microbiology**, 1986.

STEVENSON, J. R.; STONGER, K. A. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. **Am. J. Vet. Rev.**, Chicago, v.41, n.4, p.650-653, Apr.1980.

TIZARD, I. R. Regulação da resposta imunoadquirida. In: **Imunologia Veterinária: uma introdução.** 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002. cap. 17, p. 209-213.

TIZARD, I. R. Aplicação diagnóstica dos testes imunológicos. In: **Imunologia Veterinária: uma introdução.** 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002. cap. 18, p. 214-232.

TROXEL, T.R. et al. Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.75, n.1, p.19-25, Jan.1997.

UZAL, F.A. et al. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. **Vet. Rec.**, London, v.152, n.5, p.134-136, Feb. 2003.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I

Meio experimental para anaeróbios

Peptona.....	8g
Extrato de levedura.....	2g
Extrato de carne.....	1.2g
Glicose.....	5g
NaCl.....	2g
L-cysteína.....	0.2g
Caldo de Fígado.....	200 ml *
Água destilada.....	200 ml

Ajustar o pH a 7.6 e autoclavar a 121°C, por 15 minutos.

* Caldo de fígado:

Fígado bovino.....	500g
Água destilada.....	1000 ml

Cortar o fígado em partículas pequenas, colocar em um béquer com a água destilada e deixar sob refrigeração da noite para o dia. Ferver durante 10 minutos, filtrar e clarificar em papel filtro. Ajustar o pH a 7.6.

9.2 Anexo II

Meio de cultura descrito por Claus & Macheak, 1972.

Caldo de carne.....	600 ml *
Água destilada.....	400 ml
Peptona.....	10g
NaCl.....	5g
Cloridrato de l-cysteína.....	0.3g
Amido solúvel.....	1g
Glicose.....	0.5g

OBS: o protocolo do * caldo de carne é idêntico ao caldo de fígado mas substitui por coxão mole moído.

Ajustar o pH a 7.2 e autoclavar a 121°C, por 15 minutos.