

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE VACINAS CONTRA *Clostridium tetani* COMERCIALIZADAS NO BRASIL

Francisco Carlos Faria LOBATO^{1*}, Felipe Masiero SALVARANI²,
Ronnie Antunes de ASSIS³, Eduardo Henrique Moreira LIMA⁴,
Catarina Guimarães Rocha Dourado LIMA⁵, Rodrigo Otávio Silveira SILVA⁶,
Prhiscylla Sadanã PIRES⁶

RESUMO: O tétano é uma síndrome neurológica infecciosa ocasionada pela ação da toxina tetânica, produzida por *Clostridium tetani*, que age no sistema nervoso central, caracterizando-se por um quadro de paralisia espástica. Neste trabalho foi avaliada a potência de oito vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *C. tetani*, pela titulação de antitoxina tetânica em soro de coelhos e cobaios vacinados, empregando-se a técnica de soroneutralização em camundongos. As vacinas codificadas como T2, T4, T5 e T8 apresentaram, em coelhos e cobaios, títulos superiores ao nível mínimo exigido no teste de 2,5 UI/ml, recomendado para controle desse produto. As vacinas T1, T3, T6 e T7 não induziram títulos protetores. Os resultados demonstram que 50% das vacinas contra *C. tetani* testadas, comercializadas no Brasil, foram ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado.

Termos para indexação: clostridioses, tétano, toxina tetânica, vacina.

EVALUATION OF THE POTENCY OF VACCINES AGAINST *Clostridium tetani* COMMERCIALIZED IN BRAZIL

ABSTRACT - Tetanus is an infectious neurological syndrome caused by the action of the tetanus toxin, produced by *Clostridium tetani*, which acts in the central nervous system, characterizing itself by a spastic paralysis scenario. The antibody response to the *C. tetani* component of eight commercial vaccines was evaluated by the mice serum neutralization test with rabbit and guinea pigs sera. T2, T4, T5 and T8 induced titles of *C. tetani* antitoxin superior to the recommended minimum title of 2.5 IU/ml. The vaccines T1, T3, T6 and T7 did not induce protection titles. A total of 50% of the *C. tetani* vaccines commercialized in Brazil were unable to induce the minimum antibody response recommended for the approval of the product.

Index terms: clostridiosis, tetanus, tetanus toxin, vaccine.

INTRODUÇÃO

O tétano é uma toxi-infecção altamente letal que acomete os mamíferos. A patogenia da doença envolve a penetração de

esporos de *Clostridium tetani* em feridas, com conseqüente multiplicação e produção de uma potente neurotoxina, a tetanospasmina. Essa age no sistema nervoso central bloqueando a liberação de neurotrans-

¹ Médico Veterinário, Professor de Doenças Bacterianas da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. e-mail: flobato@vet.ufmg.br *Autor de correspondência

² Médico Veterinário, mestrando em Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG.

³ Médico Veterinário, Doutor em Ciência Animal. Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

⁴ Médico Veterinário.

⁵ Médica Veterinária, mestranda em Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG.

⁶ Aluno de Iniciação Científica, Escola de Veterinária da UFMG.

missores inibitórios nas fendas pré-sinápticas, principalmente a glicina, levando ao quadro de paralisia espástica (LINK et al., 1992).

Devido às características ecológicas de *C. tetani*, aliadas aos fatores predisponentes, a principal medida de controle da doença é a utilização de toxóides que visam a redução da mortalidade e das conseqüentes perdas econômicas. Embora não exista notificação oficial sobre a ocorrência de tétano nos animais, estima-se que aproximadamente 70% dos acometidos venham a óbito (LATHAM et al., 1995).

As vacinas comercializadas no Brasil contra as clostridioses são compostas de múltiplos antígenos e as normas para controle desses produtos biológicos estão definidas na legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1997).

No Brasil são produzidas em torno de 140 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, comprovando a grande utilização desses imunógenos. Entretanto, apenas a bacterina contra *Clostridium chauvoei* e os toxóides botulínicos C e D são submetidos ao controle oficial. No Brasil, vários foram os trabalhos realizados para avaliar a eficiência das vacinas clo-

stridiais comercializadas (LOBATO, 1989; AZEVEDO et al., 1998, LOBATO et al., 2000; DIAS, 2003; LOBATO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004) e demonstraram que a maioria dos imunógenos não estimulou níveis mínimos de anticorpos neutralizantes compatíveis com os dos teste recomendados para controle destes produtos.

Em razão da inexistência de um controle oficial que ateste a qualidade das vacinas contra *C. tetani*, objetivou-se avaliar a eficiência de oito vacinas comerciais, mono e polivalentes que continham em sua composição toxóide tetânico, através de testes de potência, esterilidade e inocuidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas oito vacinas de laboratórios veterinários que, nos anos de 2004 e 2005, comercializavam no Brasil vacinas mono e polivalentes que continham toxóide tetânico em sua composição. Como controle positivo foi utilizado um toxóide tetânico padrão contendo 340 UI por ampola, fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (FIOCRUZ). Como controle negativo foi utilizada salina estéril a 0,85% (Tabela 1).

TABELA 1 – Composição das vacinas contra clostridioses e controles utilizados

Vacina	Composição
T1	<i>C. tetani</i>
T2 ¹	<i>C. tetani</i>
T3	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> e <i>C. tetani</i>
T4	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipo D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. tetani</i> , <i>Corynebacterium pseudotuberculosis ovis</i> e <i>moxidectina</i>
T5	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> e <i>C. tetani</i>
T6	<i>C. tetani</i>
T7 ¹	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i> e <i>C. haemolyticum</i>
T8	<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D, <i>C. novyi</i> tipo B, <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. haemolyticum</i>
Controle Positivo	Toxóide tetânico padrão
Controle Negativo	Salina estéril a 0,85%

¹ Vacinas produzidas pelo mesmo fabricante.

Para a realização do teste foi empregada uma toxina tetânica padronizada ao nível L+/10 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,1UI de antitoxina padrão homóloga, causa a morte de 100% dos camundongos inoculados, num período de 72 horas), segundo a BRITISH PHARMACOPEIA (1998), e antitoxina padrão contendo 1000UI por ampola adquirida do National Institute Biological Standart and Control (NIBSC, Inglaterra).

Na avaliação da inocuidade foram utilizados, por vacina, cinco cobaios adultos, (*Cavia porcellus*), linhagem English Short Ear, fêmeas, com pesos variando entre 350 e 450 g, cedidos pelo Biotério do Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Pedro Leopoldo, Minas Gerais (LANAGRO/MG). Os animais foram inoculados por via subcutânea com 2 ml da vacina (BRASIL, 1997). No teste de esterilidade foi inoculado 0,5ml de cada vacina em quatro tubos contendo 20 ml de caldo tioglicolato (Difco Laboratories LTDA, USA) e em quatro tubos contendo 20ml de caldo *sabouraud* (Difco Laboratories LTDA, USA), sendo dois tubos de cada meio incubados em ambiente de anaerobiose e os outros dois em ambiente de aerobiose, todos a 37°C por 21 dias, realizando-se leituras diárias (BRASIL, 1997).

No teste de eficiência, para cada imunógeno foram utilizados oito coelhos adultos, (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, fêmeas, com pesos variando entre 1,8 e 2,6 kg e oito cobaios adultos. No grupo controle positivo, os animais receberam inoculações contendo 0,75 ml de toxóide padrão reconstituído, nos dias zero e 21. A sangria foi realizada no 35º dia após a primeira inoculação. No grupo controle negativo, a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85%. Nos outros oito grupos, cada animal foi vacinado com a menor dose recomendada pelo fabricante, nos dias zero e 21. A sangria foi realizada no 35º dia após primo-vacinação e os soros obtidos em cada grupo foram misturados em partes iguais, constituindo-se um *pool*, e armaze-

nados a -20°C até a realização dos bioensaios (BRITISH PHARMACOPEIA, 1998).

O teste de potência foi determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos. Utilizou-se 1,0 ml de toxina contendo 1,0 UI (10L+/10) misturado a 1,0 ml do soro de coelhos e cobaios, não diluído e nas diluições: 1:2; 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20. Cada mistura foi homogeneizada, incubada a 37°C por 60 minutos, e inoculada na dose de 0,2 ml por via endovenosa, em dois camundongos por diluição, (*Mus musculus*), raça Swiss, linhagem Webster, fêmeas, com pesos variando entre 17 e 22 g. Os animais foram observados por 72 horas, registrando-se as mortes ocorridas. A vacina foi aprovada no teste de potência quando o título do *pool* de soros dos coelhos ou cobaios imunizados fosse igual ou superior a 2,5UI/ml (BRITISH PHARMACOPEIA, 1998).

A análise estatística empregada para comparar os resultados dos títulos de anticorpos obtidos em coelhos e cobaios foi calculada utilizando a correlação não paramétrica de Spermam (SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na padronização da toxina tetânica no nível de teste L+/10, o título foi de 1770 L+/10/ml. Nos testes de inocuidade e esterilidade, todas as vacinas testadas estavam dentro dos padrões determinados pelo MAPA (BRASIL, 1997).

O resultado da titulação dos soros de coelhos e cobaios vacinados são apresentados na Tabela 2. No *pool* de soros de coelhos e cobaios imunizados com o toxóide tetânico padrão, observou-se título de antitoxina tetânica de 2,5UI/ml, nível mínimo exigido no teste de potência. Resultado semelhante foi observado nos soros de coelhos vacinados com a vacina T5. As vacinas T2, T4 e T8 induziram em coelhos títulos de 7,2 UI/ml, 6,0 UI/ml e 5,0 UI/ml, respectivamente. Essas vacinas apresentaram títulos de anticorpos superiores ao nível mínimo de 2,5 UI/ml preconizado pela BRITISH PHARMACOPEIA (1998). As va-

cinas T2, T5 e T8 induziram em cobaios níveis de anticorpos de 7,2 UI/ml, 3,0 UI/ml e 5,6 UI/ml, respectivamente, superiores ao nível mínimo preconizado. Nos soros dos cobaios e dos coelhos vacinados com T1, T3, T6, T7 e salina estéril a 0,85%, não foram detectados anticorpos neutralizantes

com o nível de teste empregado. A vacina T4 foi testada em cobaios, entretanto por possuir em sua composição moxidectina, antiparasitário letal a essa espécie animal, cinco dos oitos cobaios inoculados vieram a óbito, tornando os dados desse ensaio inconsistentes.

TABELA 2 - Títulos de antitoxina tetânica em pool de soro de coelhos e cobaios vacinados

Vacina	Título UI/ml (cobaios)	Título UI/ml (coelhos)
T1	-	-
T2	7,2	7,2
T3	-	-
T4	NT	6,0
T5	3,0	2,5
T6	-	-
T7	-	-
T8	5,6	5,0
Controle positivo	2,5	2,5
Controle negativo	-	-

NT = não testada

Comparando os resultados obtidos em cobaios e coelhos foram observados títulos de anticorpos iguais para vacina T2 e toxóide padrão. Ocorreram variações nos títulos de antitoxina para as vacinas T5 e T8. Em ambos resultados os títulos foram superiores ao título mínimo exigido, indicando que, para os testes de vacinas antitetânicas, podem ser utilizados tanto coelhos quanto cobaios, pois existe associação entre os títulos obtidos para ambas as espécies, com correlação de 99,58%.

Ressalta-se que, mesmo sem a implantação do controle oficial de todos os componentes das vacinas contra clostridioses, a Lei 8.078 (BRASIL, 1990), consagrada como Código de Defesa do Consumidor, estabelece clara responsabilidade do fabricante pela qualidade de seus produtos enquanto que a Portaria 301 (BRASIL, 1996), do MAPA, em seu Artigo 21 exige que toda partida de produto biológico, antes da comercialização, deverá ser submetida, conforme o caso, aos seguintes controles:

esterilidade, pureza, inocuidade, eficácia, sorologia, potência/imunogenicidade.

Estudos já citados, realizados no Brasil e o presente experimento com *C. tetani*, tem demonstrado que, em sua maioria, as vacinas contra clostridioses não induzem respostas imunes adequadas.

CONCLUSÃO

As vacinas comercializadas no Brasil de uso veterinário, contra *C. tetani*, foram em sua maioria, ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado para este produto, indicando a necessidade urgente do controle da eficiência destes imunógenos.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.50, n.3, p.239-242, 1998.

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Lei n. 8078, 11 de setembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de setembro de 1990. Suplemento n. 176.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 301, 19 de abril de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de abril de 1996. Seção 1:7013-7018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, 12 de maio de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1:10168-10169.
- BRITISH PHARMACOPEIA. Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines. Department of Health and Social Security, Medicines Commission. England. 1998
- DIAS, L. D. **Avaliação da eficiência de vacinas contra *Clostridium septicum***. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Minas Gerais. Medicina Veterinária. 2003. 43p.
- LATHAM, W. C.; BENT, D. F.; LEVINE, L. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. **Applied Microbiology**, Washington, v.10, n.2, p146–152, 1962.
- LINK, E.; EDELMANN, L.; CHOU, J. H. et al. Tetanus Toxin Action: Inhibition of Neurotransmitter Release Linked to Synaptobrevin Proteolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Oxford, v. 189, n.2, p. 1017-1023, 1992.
- LOBATO, F. C. F. **Avaliação de imunógenos antitoxinogênicos em uso no Brasil**. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Minas Gerais. Medicina Veterinária. 1989. 58p.
- LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O. et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e epsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.313-318, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; BALSAMÃO, G. M. et al. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.439-442, 2004.
- NASCIMENTO, R. A. P.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.1, p.1-6, 2004.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.