

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Clostridioses: patogenia, prevenção e vacinas

Caroline Marques dos Santos

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Marco Antônio Stephano

São Paulo

2020

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
4. RESULTADOS	7
5. DISCUSSÃO	7
6. CONCLUSÃO	24
7. BIBLIOGRAFIA	26
8. ANEXOS	32

LISTA DE ABREVIATURAS

MAPA	<i>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</i>
BoNT	<i>Neurotoxina botulínica</i>
TeNT	<i>Neurotoxina Tetânica</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
CctA	<i>Toxina A de Clostridium chauvoei</i>
PCR	<i>Reação em Cadeia de Polimerase</i>
ATX	<i>Toxina alfa</i>
CPA	<i>Toxina alfa de Clostridium perfringens</i>
CPB	<i>Toxina beta de Clostridium perfringens</i>
CPB2	<i>Toxina beta-2 de Clostridium perfringens</i>
CPE	<i>Enterotoxina de Clostridium perfringens</i>
ETX	<i>Toxina épsilon de Clostridium perfringens</i>
ITX	<i>Toxina iota de Clostridium perfringens</i>
BEC	<i>Enterotoxina binária</i>
NetB	<i>Toxina tipo beta de enterite necrótica</i>
TpeL	<i>Toxina perfringens grande</i>
HC	<i>High Chain (Cadeia pesada)</i>
PLGA	<i>Poliácido glicólico-láctico</i>
BPF	<i>Boas Práticas de Fabricação</i>

RESUMO

SANTOS, C.M. **Clostridioses: patogenia, prevenção e vacinas**. 2020. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Palavras-chave: Clostridioses, *Clostridium*, vacinas veterinárias, toxoides

INTRODUÇÃO: O gênero *Clostridium* é composto de bactérias obrigatoriamente anaeróbicas, geralmente Gram-positivas, com mais de 200 espécies e subespécies distribuídas na maior parte dos ambientes. Apesar da alta variedade, apenas cerca de 20 delas têm importância como causadoras de doenças em seres humanos e animais. O grupo de doenças causadas pelos clostrídios é chamado de clostridioses. No campo da veterinária as manifestações mais comuns dessas são as patogenias neurotrópicas, histotóxicas e enterotóxicas. Todos os anos as clostridioses são motivo de grandes perdas econômicas na pecuária, já que sua infecção pode acontecer por diversos meios de contaminação. Devido a fatores de virulência resistentes às condições adversas, a eliminação desses microrganismos do ambiente não é possível, sendo fundamental a vacinação. **OBJETIVO:** Esta revisão da literatura aborda os aspectos patogênicos relacionados aos clostrídios mais comuns na veterinária, analisando suas características, prevenção e seu controle através das vacinas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os artigos serão selecionados pelas bases de dados científicas mais atuais no assunto, publicados preferencialmente do período de 2015 a 2020. A procura será realizada por palavras-chave, título e autor. **RESULTADOS:** A partir da análise crítica da literatura selecionada, foi elaborado o texto descritivo, o qual contém as informações mais atuais sobre as clostridioses. **CONCLUSÃO:** A pecuária é uma das maiores áreas da economia do país, portanto, é de interesse entender sobre as doenças que acometem os animais, como as clostridioses, e discutir sobre as medidas profiláticas necessárias por meio de vacinas. Espera-se assim apresentar informações mais atuais e relevantes sobre essas questões.

1. INTRODUÇÃO

Os *Clostridium* são pertencentes a um gênero de bactérias presentes nos mais variados ambientes, como solos, sedimentos marinhos, produtos em decomposição e até mesmo na microbiota animal e humana.¹ São caracterizados como bacilos Gram-positivos, anaeróbios, formadores de esporos, incluídos no filo dos *Firmicutes*, com uma variedade de aproximadamente 200 espécies conhecidas. Apesar disso, limitam-se a 11 o número de clostrídios patogênicos para animais.²

A descoberta das bactérias conhecidas como *Clostridium* aconteceu de maneiras diversas. Em meados do século XIX um cientista germânico, chamado *Justinus Kerner* (1786–1862) desejava compreender a causa de intoxicações alimentares por salsichas e encontrou células em formato de bastão em suas amostras. O biólogo belga *Emile van Ermengem* (1851–1932) encontrou estes microrganismos formadores de esporos, que mais tarde foram classificados como *Bacillus*. Somente no século XX os *Clostridium* foram diferenciados como bactérias com esporos, em forma de bacilo e com metabolismo anaeróbico.³

A definição de uma bactéria em aeróbica, anaeróbica ou facultativa depende dos meios de reação que ela necessita para seu metabolismo. Os organismos aeróbicos obtêm energia por carbono consumindo oxigênio e são incapazes de sobreviver na ausência deste. Os anaeróbios, ao contrário, são inibidos pelo oxigênio e utilizam outras substâncias para o metabolismo, pela fermentação, por exemplo. Neste caso o oxigênio pode ser tóxico para o crescimento, possivelmente reagindo com componentes celulares pelo potencial de óxido-redução.⁴

A patogenia depende de muitos fatores e um dos mais importantes é a interação do *Clostridium* com o ambiente. Fatores ambientais determinam se a bactéria ou seu esporo germinará e produzirá as toxinas, como um ambiente de anaerobiose, meio nutritivo, entre outros. Por exemplo, em condições

desfavoráveis a probabilidade de que o *Clostridium* produza esporos é maior, podendo infectar os solos e alimentos por um período considerável de tempo.⁵

Esporos são formas latentes da célula com maior resistência física. Estão localizados no interior da célula, sendo também denominados de endosporos. Uma vez favorável o meio para seu crescimento (no caso dos clostrídios a ausência ou baixo teor de oxigênio e oferta ampla de nutrientes) o endósporo germina e passa para forma vegetativa.⁶

Além dos endosporos, estes organismos geram as exotoxinas. Exotoxinas são substâncias com atividade tóxica com ação longe do sítio de sua liberação. Cada *Clostridium* produz uma ou mais toxinas, com diferentes potências.⁶

Conforme demonstrado, esses microrganismos possuem diferentes fatores de virulência (as exotoxinas e endósporos são os fatores da patogenia). "Clostridioses" é o nome dado ao grupo de enfermidades potencialmente fatais causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium*, as quais podem ser verificadas em três formas: neurotrópica (botulismo e tétano), histotóxica (gangrena gasosa, carbúnculo sintomático, hemoglobinúria bacilar) e enterotoxêmica.⁷

A transmissão dos clostrídios acontece pelo contato dos esporos com ferimentos, ingestão por alimentos e água contaminados, ou ainda em animais com baixa imunidade (Ocasionalada pelo uso de antibióticos, idade, cirurgias, outras doenças, entre outros) os microrganismos da própria microbiota se tornam patogênicos.⁸ No caso do *C. botulinum* ou do *C. tetani* o contágio acontece por interação com as toxinas pré-formadas.⁷

Clostridioses neurotrópicas são divididas em Botulismo e Tétano. O Botulismo é uma doença causada pelas neurotoxinas produzidas pelo agente *Clostridium botulinum*, também conhecidas como BoNTs. Resulta em paralisia muscular, sendo mais comuns os tipos C e D em animais.⁹ O tétano é resultado da neurotoxina tetanospasmina do *C. tetani*, a qual bloqueia a ação inibitória do SNC (sistema nervoso central).¹⁰

A clostridioses histotóxicas são o carbúnculo sintomático, gangrena gasosa ou edema maligno, hemoglobínúria bacilar e hepatite necrótica. O carbúnculo sintomático tem como agente principal o *C. chauvoei*, este produz cinco toxinas diferentes e causa traumas musculares.¹¹ A gangrena gasosa, também conhecida como edema maligno ou mionecrose clostridial, é causada pelos agentes *C. sordellii*, *C. septicum*, *C. perfringens* do tipo A e *C. novyi* do tipo A, sendo sua principal característica a necrose de tecidos.^{12 13} A hemoglobínúria bacilar é uma infecção que causa hemólise, cujo causador é o *C. haemolyticum*. O *Clostridium novyi* do tipo B é responsável pela hepatite necrótica.⁸

Entre as enterotoxemias, infecções do trato gastrointestinal, os principais causadores são o *Clostridium difficile*, o *C. perfringens* dos tipos A, *C. sordelli* e *C. septicum*.^{14 8} A forma clínica da doença é a diarreia, podendo ocasionar também colite fulminante e colite pseudomembranosa.¹⁵

O diagnóstico nos casos de doenças causadas por clostrídios pode ser feito pela análise de material biológico, como soro sanguíneo, amostra dos tecidos lesados ou fezes. Devido à alta letalidade e a rápida incubação dos agentes, muitas vezes o diagnóstico é feito apenas após a morte do animal, tornando inviável o tratamento por antibióticos.⁷

O alto custo da morte dos animais doentes gera perdas econômicas consideráveis. Estima-se que cerca de 500 mil animais ao ano são afetados, o que significa uma perda de aproximadamente 1,1 bilhão de reais,¹⁶ além da possibilidade de um animal contaminado poder transmitir o agente aos seres humanos, como o *C. perfringens*, que ocasiona em enterotoxemias graves.⁸ Levando em consideração esses fatores, a profilaxia e a vacinação combinados trariam melhor controle das doenças.

As vacinas disponíveis no mercado atual são composições bacterina-toxoides ou somente toxoides, de diferentes espécies de *Clostridium*, geralmente nas formas mono ou polivalentes, porém de métodos de produção tradicionais, os quais podem ter inconvenientes como a infraestrutura de biossegurança, as

diferenças de quantidade entre lotes, entre outros. Novos métodos têm surgido a fim de superar essas questões, como o desenvolvimento de vacinas recombinantes criadas por engenharia genética, ou métodos de liberação por vetores.^{10 17}

Para garantir a segurança e eficácia, as vacinas devem seguir, desde o seu desenvolvimento até o produto final, uma série de leis e é vital que seu processo seja bem controlado por testes de qualidade e siga as boas práticas de fabricação (BPF)¹⁸, a fim de minimizar respostas imunes indesejadas, como provocar a doença e garantir a menor toxicidade possível.¹⁹

Dessa forma, considerando que o Brasil é o maior exportador mundial de carnes e um dos maiores produtores agropecuários tanto de bovinos como de outros animais, entender as doenças veterinárias é de suma importância.²⁰ As clostridioses são muito comuns, sendo de notificação obrigatória²¹ e de alta letalidade. Como os tratamentos por antibióticos se tornam inviáveis, as vacinas são a melhor alternativa como profilaxia.

2. OBJETIVO(S)

A proposta do trabalho é revisar e analisar os principais aspectos das clostridioses veterinárias, demonstrando sua patogenia, suas formas de contágio e de transmissão, além de seu diagnóstico.

O objetivo também é apresentar e discutir como as clostridioses podem ser prevenidas pelo uso de vacinas, fabricadas por diversos métodos, destacando técnicas de vacinas comerciais tradicionais e comparar com as novas tecnologias que surgiram nos últimos dez anos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão da literatura foi feita escolhendo artigos e revisões por meio de bases de dados científicas: PubMed, ScienceDirect, Scielo, CrossRef e por ferramentas de busca como Google Acadêmico. O período de publicação foi

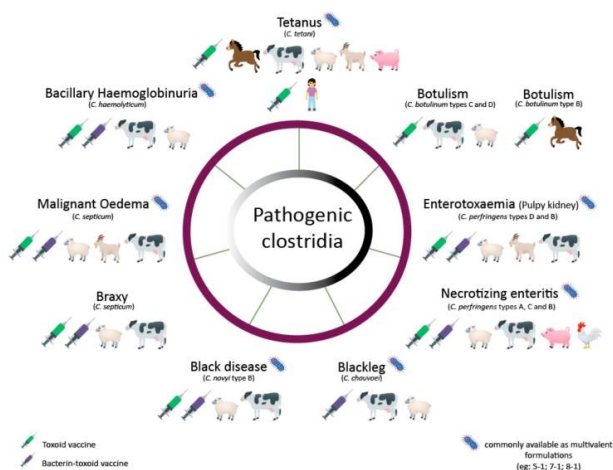
priorizado de 2015 a 2020, exceto no caso de livros e artigos científicos consolidados no tema.

A pesquisa realizada se deu por palavras-chave e termos: “Clostridial diseases”; “Clostridium infections”; clostridioses veterinárias; “Clostridium toxoids”; “vaccine production”, entre outras relacionadas. Primeiro o filtro utilizado foi por título, autor e ano de publicação, seguido por análise do abstract ou resumo, selecionando também por relevância e número de citações. Os idiomas são o português e inglês, excluindo-se os demais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em conta que as clostridioses são um dos principais grupos de doenças que acometem os animais na pecuária e seu tratamento é difícil, dependendo de ações profiláticas como a vacinação, é relevante que se pesquise sobre seus mecanismos e manifestações. Neste trabalho serão apresentadas a seguir as principais clostridioses que infectam animais da pecuária e suas patogêneses, as quais passam pela classificação em neurotóxicas, histotóxicas e enterotóxicas.

Figura 1: Clostridioses veterinárias, animais mais afetados e vacinas comerciais



Fonte: ZARAGOZA, Nicolas E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. Toxins, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.

4.1. Clostridioses neurotrópicas

4.1.1. Botulismo

O Botulismo é uma doença causada pelas toxinas produzidas pelo agente *Clostridium botulinum*, também conhecidas como neurotoxinas botulínicas ou BoNTs.⁹ Elas são substâncias altamente letais e tóxicas aos humanos e animais, causando inúmeras perdas e são potenciais armas biológicas do bioterrorismo.⁸

As cepas de *Clostridium botulinum* e outras *Clostridium* que produzem essas neurotoxinas são classificadas em quatro diferentes grupos (I a IV) de acordo com seu metabolismo, genética e taxonomia.²² No caso de infecções em animais, o botulismo mais comum é causado pelo grupo III, enquanto os grupos I e II estão mais relacionados com casos em humanos.^{23 9}

As neurotoxinas botulínicas por sua vez, são divididas em sete tipos diferentes de A a H, ordenadas segundo suas propriedades metabólicas e proteolíticas ou não, nas quais os tipos C e D (não-proteolíticos) acometem geralmente os animais e os demais em humanos, com algumas exceções.^{24 25}

As vias de contaminação são a exposição ambiental aos esporos que estão presentes no solo, água e em carcaças de animais, sendo a ingestão a forma mais comum, muitas vezes em casos de osteofagia, na qual a deficiência de fósforo faz com que se alimentem dos ossos de animais mortos ou da própria carcaça.²⁶ Porém, existem episódios pontuais da entrada do microrganismo por ferimentos expostos, no qual o esporo germina e produz as toxinas na lesão.²⁷

As toxinas botulínicas têm estruturas semelhantes, com duas cadeias proteicas ligadas por ponte de dissulfeto, o que impede sua degradação pelo suco gástrico do animal.^{28 29} Após colonização de *Clostridium botulinum* intestinal e produção de toxinas, a BoNT realizará uma transcitose para mucosa do epitélio intestinal. Uma vez absorvida, atinge a circulação sanguínea e tem afinidade pelos neurônios motores da junção neuromuscular, onde impede a liberação de

acetilcolina e por consequência inibe a transmissão excitatória, causando paralisia muscular.^{28 30}

Os sinais clínicos da doença variam de espécie para espécie, do período de incubação e da quantidade de toxinas ingeridas. O principal sinal é a paralisia, em aves nas asas e patas, em bovinos dificuldade para se movimentar, constipação, fraqueza e em peixes a paralisia das barbatanas.⁸

A prevalência do botulismo é maior nas aves e em ruminantes, ocorrendo eventualmente em outros animais.²²

4.1.2. Tétano

O tétano é uma doença neurológica ocasionada pelo *Clostridium tetani*, altamente fatal, ocorrendo em humanos e animais, incluindo ruminantes e principalmente equinos, os quais são muito sensíveis a toxina tetânica.⁸ A enfermidade acontece quando feridas expostas, pós cirurgias e castrações dos animais (ou feridas do cordão umbilical de potros) permitem o contato com esporos do agente, que germinam em baixos potenciais de óxido-redução e anaerobiose.^{8 31}

A toxina responsável pela patogênese é a tetanopasmina, ou neurotoxina tetânica (TeNT), ainda que o *C. tetani* produza também a toxina tetanolisina (formadora de poros). A TeNT é uma metaloprotease dependente de zinco, que quando absorvida se liga aos neurônios motores inibidores do SNC e impede a liberação dos neurotransmissores, consequentemente, provoca uma constante contração dos músculos.^{30 32}

Os primeiros músculos atingidos pela ação da toxina tetânica são os da mandíbula e do pescoço (em inglês existe a expressão *lockjaw*), sendo um dos sintomas mais característicos. Outros sinais clínicos são espasmos involuntários, dificuldade de movimento, sinais neurológicos tais como agitação, ansiedade ou depressão e convulsões.³¹ Curiosamente, o efeito da toxina é variável entre as espécies, inclusive, répteis e animais de sangue frio são praticamente resistentes,

enquanto que, em cavalos e pequenos ruminantes, pequenas doses já podem resultar na rápida letalidade.⁸

4.2. Clostridioses Histotóxicas

4.2.1. Carbúnculo sintomático

Carbúnculo sintomático (manqueira, "mal-de-ano" ou em inglês *blackleg*) é uma infecção aguda cujo agente etiológico é o *Clostridium chauvoei* caracterizada pela mionecrose e alguns casos de morte súbita, acomete principalmente bovinos, apesar de existirem casos reportados em humanos.^{33 34 35}

Os mecanismos da doença ainda não estão completamente elucidados, porém o que se sabe é que o agente poderia estar como esporo alojado na musculatura e, em uma ferida que ocasionasse um ambiente anaeróbio, haveria a germinação e a ação necrosante das toxinas.¹⁰

O *Clostridium chauvoei* é uma bactéria Gram positiva formadora de esporos e anaeróbica, muito semelhante geneticamente ao *Clostridium septicum*.¹⁰ Os fatores de virulência incluem DNase, hialuronidase, neuraminidase e flagelo.^{11 35} A toxina A de *C. chauvoei* (CctA), da família das leucocidinas, é apontada como responsável pela atividade citotóxica e hemolítica, sendo seu modo de ação formar poros na membrana celular e por consequência a lise.³³

Devido a rápida patogênese em muitos animais não há sinais clínicos aparentes, encontrados apenas após a sua morte. Nos casos semi-agudos ainda podem apresentar letargia, prostração e como já citado nos casos miocárdicos ocorre a morte súbita. O principal diagnóstico é identificação do agente por PCR em amostras de tecido muscular lesionado.³⁶

Estudos analisaram o impacto econômico do carbúnculo sintomático para pequenos fazendeiros nos países de Laos e Etiópia, demonstrando perdas financeiras consideráveis, o que já se mostrava no mundo todo.^{37 38} Além do fator

econômico, por se alastrar rapidamente, não é viável o uso de antibióticos, então medidas profiláticas são necessárias para mitigar e impedir a morte dos animais.

A melhor medida profilática é a vacinação, já que o manejo animal, como trocar o ambiente e a silagem, isoladamente não demonstra resultados suficientes.³⁹ A produção da vacina contra o *C. chauvoei* é feita a partir de massa bacteriana inativada, uma vez que os mecanismos das toxinas e quais atuam exatamente não estão claros.³⁰

4.2.2. Gangrena gasosa

A gangrena gasosa é infecção que causa necrose dos tecidos moles, podendo ter como agentes bactérias anaeróbicas como *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. sordelli*, entre outras. Pode acometer ruminantes, cavalos e humanos, com poucos casos em outros animais. Assim como no carbúnculo sintomático pouco se sabe sobre a patogênese, mas acredita-se que seja ocasionada pela presença da forma vegetativa ou de esporo que germina e entra por meio de feridas expostas e pós cirúrgico de castração.¹³

Mundialmente o agente mais comum é o *Clostridium septicum*,⁸ logo após o *C. perfringens* do tipo A, que será discutido posteriormente. O *C. septicum* é uma bactéria formadora de esporos, com motilidade e possui maior aero tolerância em relação as demais espécies.¹³ Seu principal mecanismo de virulência é a toxina alfa (ATX), da família das aerolisinas, cujo efeito é formar um poro na bicamada lipídica; é hemolítica e altamente letal.³⁰ Além de gangrena gasosa este agente pode causar a doença chamada "Braxy", caracterizada por necrose do abomaso em ruminantes.⁴⁰

Os sintomas da gangrena gasosa nos animais vivos são fraqueza, prostração, cianose ocular, taquicardia, taquipneia. Porém, na maioria das vezes, a infecção é aguda e rápida levando o animal a morte, sendo o diagnóstico pela análise do tecido necrosado, com observações macroscópicas de edema e enfisema e microscópicas evidenciando a presença de infiltrados com os bacilos.¹³

É a clostridiose com maior taxa de mortalidade, geralmente aguda e por isso de difícil tratamento. O manejo dos animais pode auxiliar na profilaxia, aumentando a higienização nas técnicas de castração ou nas cirurgias, ainda que a vacinação seja o ideal.¹⁰

4.2.3 Hemoglobinúria bacilar

O *Clostridium haemolyticum*, ou *C. novyi* do tipo D, é o causador desta clostridiose. A patogênese é mais comum em bovinos e poucos casos em ovinos, sendo a distribuição geográfica variada com aumento de episódios em solos próximos a rios ou úmidos.^{8 41} O modo de ação do agente se dá quando o animal ingere o alimento contaminado com o esporo e há um intermédio da *Fasciola hepática*, na qual as larvas deste verme causam danos ao tecido do fígado e um ambiente de anaerobiose, favorecendo a germinação do *C. haemolyticum*.⁷

O *C. haemolyticum* é muito semelhante ao *C. novyi* do tipo B, este causador da hepatite necrótica. É uma bactéria formadora de esporos e anaeróbia e sua patogênese se deve a toxina hemolítica beta, conhecida como fosfolipase do tipo C, cujo mecanismo é causar lise dos hepatócitos, levando a agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular.^{42 10}

Os sintomas em estados subagudos são em consequência da anemia, como fraqueza e febre, porém, na maioria dos casos o animal já é encontrado morto, sendo o diagnóstico a análise de fragmentos hepáticos danificados.⁸

4.2.4 Hepatite necrótica

A hepatite necrótica (*black disease*) é muito semelhante a hemoglobinúria bacilar, já que o *Clostridium novyi* do tipo B é próximo do *C. haemolyticum*, sendo diferenciada apenas pelos achados histológicos e a anemia hemolítica que não ocorre na hepatite necrótica.⁴¹ É mais comum em ruminantes e altamente letal em ovelhas.⁸

Assim como na hemoglobínúria, a patogênese depende de agentes como a *Fasciola hepática* ou ainda o *Cysticercus tenuicollis*, os quais facilitam a migração dos esporos ingeridos para o fígado nas células de *Kupffer*. O principal fator de virulência é a toxina alfa, da família das citotoxinas clostridiais, cuja ação é interagir com as proteínas de actina do citoesqueleto afetando a conformação da célula. Apesar da forma vegetativa de *C. novyi* do tipo B também produzir certa quantidade de beta toxina.^{40 10}

Os sintomas agudos da doença incluem isolamento e a não movimentação do animal, com aumento de temperatura corporal. Ainda assim, na maioria dos casos o curso da doença é a morte em algumas horas, em ruminantes de um a dois dias, nos casos superagudos os animais não apresentam sintomas e são encontrados já falecidos e com a necrose.⁴⁰

4.3. Enterotoxemias

O *Clostridium perfringens*, entre os *Clostridium*, é o que produz maior quantidade e variedade de toxinas, sendo um dos principais causadores de enterotoxemias, assim como enterites hemorrágicas, além do *Clostridium difficile*. Por mecanismos ainda não muito conhecidos, em condições ideais como estresse, há uma predisposição para seu crescimento e produção de toxinas letais. A doença é descrita como lesões necróticas com presença de hemorragia no intestino do animal. A prevalência varia de espécie e de tipo de cepa.⁴⁴

O *C. perfringens* é uma bactéria anaeróbia, fermentadora, formadora de esporos encontrada na microbiota natural de seres humanos e animais. A sua classificação é feita de acordo com as toxinas produzidas, variando do tipo A ao E (mais recentemente foram acrescentados os tipos F e G)⁴³, resumidos na Tabela 1, baseado na presença dos genes para toxina alfa, beta, épsilon e iota, existindo ainda outras como perfringolisina O, enterotoxina (CPE), enterotoxina binária (BEC), toxina tipo-beta de enterite necrótica (NetB), toxina perfringens grande (TpeL) e toxina-beta2.^{44 45}

O *C. perfringens* do tipo A está relacionado com casos em mamíferos, principalmente, porém nada foi comprovado que possa causar diretamente as enterotoxemias, visto que é normalmente encontrado na microbiota de animais saudáveis.⁸ A toxina que mais produz é CPA, porém estudos mais atuais mostraram a produção de NetF em cães, que pode ser a responsável por casos de gastroenterites.

O tipo B tem como maiores fatores de virulência as toxinas beta (CPB) e a épsilon (ETX). Esta última também é secretada pelo *C. perfringens* do tipo D e é o causador de enterotoxemias em ovinos e bovinos, sobretudo em recém nascidos.⁴³

A ETX é da família das aerolisinas, é ativada por proteases do trato gastrointestinal do animal, onde realiza seu mecanismo de formação de poros, promovendo lesões cerebrais e de outros tecidos, além de aumentar a permeabilidade vascular.⁴⁶

Infecções com *C. perfringens* do tipo C tem como responsável pelas lesões nos tecidos a toxina CPB, seu maior fator de virulência. Além dela, algumas cepas produzem a CPA, CPB2 e CPE.⁴³ O mecanismo de ação consiste em formar poros na membrana, acarretando em danos no epitélio intestinal e necrose. Possui estrutura semelhante as toxinas alfa hemolisina e gamma hemolisina de *Staphilococcus* e é tripsina sensível. Atinge principalmente recém-nascidos causando enterite necrótica, em especial filhotes de porcos.^{47 43}

A toxina ETX é majoritariamente produzida pelo *C. perfringens* do tipo D, o qual ainda produz as toxinas CPA, CPE e perfringolisina O. A pró-toxina ETX entra no animal geralmente pela alimentação, no caso de ruminantes pela ingestão de carboidratos não digeríveis, os quais fermentam e favorecem o crescimento do *perfringens*. Este tipo de *C. perfringens* está muito associado a enterotoxemias em gado, caprinos e ovinos.⁴³

Tabela 1: Tipos de *Clostridium perfringens*, toxinas e fatores de virulência

Tipo de <i>C. perfringens</i>	Toxinas				Fatores adicionais de virulência		
	Alfa	Beta	Épsilon	Iota	Enterotoxina	NetB	Beta-2
A	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-
B	+	+	+	-	+/-	-	+/-
C	+	+	-	-	+/-	-	+/-
D	+	-	+	-	+/-	-	+/-
E	+	-	-	+	+/-	-	+/-

Fonte: Adaptado de ZARAGOZA, Nicolas E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.

4.4. Vacinas

As vacinas têm sido utilizadas como prevenção por séculos. O seu nascimento se deu a partir da observação de casos de varíola no século XVIII, onde os achados em animais eram mais leves em relação ao de humanos. Um cientista da época, chamado de *Edward Jenner*, resolveu então inocular parte dos fragmentos de animais nos braços das pessoas, a chamada variolação. Ele originou, dessa forma, o princípio da vacina, que nada mais é do que a inoculação do agente infeccioso morto, atenuado ou um elemento deste, sem que cause a doença, mas gere resposta imune.⁴⁸

Anos mais tarde se iniciaram as primeiras formas de vacinas, porém, de baixa potência e sem controle rígido de pureza. Conforme o desenvolvimento de novas tecnologias e com as novas descobertas de agentes etiológicos tornou-se mais viável a produção de vacinas seguras tanto para os seres humanos quanto para os animais, domésticos e da pecuária.⁴⁸

A principal função das vacinas é promover uma resposta imune de longo prazo no organismo e, pela imunização de vários indivíduos, o bloqueio das infecções e infestações na população. Na resposta imunológica, o ideal é que o antígeno apresentado leve a um reconhecimento efetivo pelo sistema imune, com

proliferação de células T e de células B ou plasmócitos (são células de memória produtoras de anticorpos específicos contra aquele determinado patógeno), responsáveis pela imunidade humoral.⁴⁹

Uma vacina eficiente é aquela que gera resposta imune suficiente com o mínimo de efeitos adversos. Para esse fim são discutidos cada vez mais sobre quais componentes devem ser acrescentados e quais as melhores tecnologias e meios para aumentar sua potência.⁴⁹

Existem diferentes tipos de vacinas produzidas, utilizando um único agente sendo monovalente ou mais de um, as vacinas polivalentes. Além disso, existe a classificação das vacinas do mercado veterinário em inativadas, as quais dependem de uma inativação do antígeno por agentes químicos, como formaldeído e geralmente precisam de adjuvantes; vivas atenuadas, que passam por processo de atenuação com formalina, que apesar de gerar uma resposta celular e humoral efetiva tem riscos quanto a reativação do agente; subunidades de membrana celular; ou ainda, as recombinantes, estas, que utilizam de engenharia genética para produzir apenas fragmentos que induzam uma imunidade.⁵⁰

O uso de antibióticos, como já visto, não é efetivo no tratamento das infecções bacterianas em animais, porque comumente são doenças agudas, as quais causam morte súbita ou pouco depois da incubação. Além desse fator, pode-se considerar também a alta nos casos de bactérias resistentes aos tratamentos, que se agrava não somente aos animais como humanos. Somando esses fatores, a vacinação é a ação profilática mais adequada, principalmente também, porque infecções bacterianas, como as clostridioses, provocam grandes perdas financeiras na pecuária.^{51 52}

As vacinas contra clostridioses no mercado brasileiro e internacional são, em sua maioria, polivalentes, abrangendo todas as doenças já apresentadas. Podem ser apenas por toxoides, ou ainda um conjunto toxoide e massa bacteriana. A sua produção segue uma série de processos, começando pela "semente" do organismo, armazenada em nitrogênio líquido e desta, uma amostra

é utilizada para uma pré-cultura. Em escala industrial é feita a fermentação da cultura em tanques. Os microrganismos em condições de anaerobiose vão gerar as toxinas, que posteriormente serão inativadas e purificadas, para então se tornar um toxoide. O antígeno é concentrado e acrescentado a um adjuvante.¹⁸

Primeiramente, a criação e concepção das vacinas veterinárias passavam por modificações dos meios de cultura com novas técnicas, aperfeiçoamento da inativação e do uso de adjuvantes. Atualmente, as abordagens para o desenvolvimento de novas vacinas são o uso de técnicas da biologia molecular como mapeamento genômico e demais “ômicas” para descobrir novos antígenos, além de tecnologias para melhor purificação e sistemas de liberação controlada.⁵⁰ Dessa forma, há sempre a relação entre o tradicional e o novo, que será discutido com ênfase nas vacinas contra costridioses, resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Resumo das clostridioses, agentes, toxinas, vacinas comerciais e recombinantes.

Agente patogênico	Tipo	Toxinas	Doença	Vacinas comerciais	Vacinas recombinantes
<i>C. botulinum</i>	Grupo I	BoNT/A, B, E e F	Botulismo (Animal e humano)	BoNT Toxóide Pentavalente A-E	rHC BoNT
	Grupo II	BoNT/B, E e F	Botulismo (Animal e humano)	-	-
	Grupo III	BoNT/C e D	Botulismo (Animal e humano)	Toxoide Bivalente BoNT/C-D (pecuária)	rHC BoNT/C
<i>C. tetani</i>	-	TeNT	Tétano	TeNT toxóide	TeNT-HC
<i>C. perfringens</i>	Tipo A	CPA	CPA: Mionecrose (animais e humanos)	Toxoide monovalente de CPA para bovinos e aviário	rCPA
	Tipo B	CPA, CPB, ETX	CPB: Enterite necro-hemorrágica, ETX: Disenteria e enterotoxemia	Toxóide de CPB e ETX ou vacina com massa bacteriana	rCPB, rETX
	Tipo C	CPA, CPB	CPB: Enterite necrótica (humanos), enterotoxemia (animais)	Toxoide CPB ou massa bacteriana (animais)	rCPB
	Tipo D	CPA, ETX	ETX: Enterotoxemia (animais)	Toxoide ETX ou massa bacteriana (animais)	rETX
	Tipo E	CPA, ITX, NetB	ITX: Enterite hemorrágica (ruminantes) e enterotoxemia (coelhos)	-	-
<i>C. chauvoei</i>	-	CctA	Carbúnculo sintomático	Massa bacteriana	rCctA
<i>C. septicum</i>	-	ATX	Gangrena gasosa, Braxy	Toxoide ou massa bacteriana	rATX
<i>C. novyi</i>	Tipo A	TcnA	Mionecrose (humanos e animais)	-	-
	Tipo B	Beta toxina	Hepatite necrótica (black disease)	Vacina toxoide (animais)	-
<i>C. haemolyticum</i>	-	Beta toxina	Hemoglobinúria bacilar	Massa bacteriana	-

Fonte: Adaptado de ZARAGOZA, Nicolas E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. Toxins, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.

As vacinas comerciais de toxoide tetânico, por exemplo, ainda são produzidas por métodos tradicionais, mas passaram e ainda passam por pesquisas de melhorias na formulação, dosagem, adjuvantes e tecnologias de produção.⁵³ No que se refere ao seu adsorvente, o hidróxido de alumínio, há certa tendência de substituição, já que existem efeitos adversos, como inflamação local, granulomas e hipersensibilidade.⁵⁴

Há indícios que o hidróxido de alumínio induza eosinófilos, os quais liberam anticorpos IgE, a mesma resposta que ocorre em alergias. O hidróxido de alumínio na sua forma cristalina tem como vantagens a alta resposta de células Th2 e ativação do sistema complemento, o baixo custo e a boa adsorção, a qual se mostrou mais efetiva do que o de fosfato. Porém, muitas desvantagens também são apontadas, tais como os efeitos adversos já citados e principalmente, o fato de não poder ser liofilizado ou congelado.^{54 55}

Contudo, os sais de alumínio têm sido utilizados como adjuvantes por mais de 70 anos, nas suas diferentes formas.⁵⁶ O uso destes adjuvantes é necessário para intensificar e modular a resposta imune que se deseja. O propósito é que melhorem a resposta celular e humoral, aumentando o tempo de ação da vacina, evitando o uso de mais doses; podem também aprimorar a resposta em indivíduos imunocomprometidos e, finalmente, auxiliar no carregamento da forma nativa do antígeno.⁵⁴

Outra melhoria na vacina seria o encapsulamento do toxoide tetânico em um sistema de liberação controlada. Em 1999, Maria Alonso⁵⁷ elaborou uma vacina com a co-encapsulação da toxina tetânica por microesferas de poliácido glicólico/lático (PLGA), o qual facilitaria a diminuição de dosagens necessárias, que só ficou comprometida pela instabilidade da toxina.⁵⁷

Segundo Wenlei Jiang e Steven P. Schwendeman,⁵⁸ o toxoide encapsulado por PLGA adicionado a excipientes (estabilizadores como a lisina) seria mais estável. Eles demonstraram, a partir de uma série de experimentos, que a vacina encapsulada com microesferas leva a liberação contínua do antígeno e aumenta a

imunogenicidade. Além disso, sabe-se que a encapsulação do toxoide tetânico por microesferas apresenta a vantagem da administração via nasal, a qual alcança vias sistêmicas onde a toxina isolada não atinge.^{53 54}

A produção de toxoide botulínico segue os mesmos processos do tetânico, com a inativação por formaldeído e o uso de adjuvantes. Seja na indústria de cosméticos ou veterinária, existem desvantagens na forma tradicional de produção, já que a toxina botulínica é um dos produtos biológicos mais perigosos ao ser humano e muitas vezes a quantidade produzida é baixa, sem uma consistência de quantidades exatas. Assim, as pesquisas por vacinas recombinantes têm se difundido a fim de minimizar essas situações, ainda que a metodologia tradicional seja efetiva.⁵¹

As vacinas recombinantes contra o botulismo podem ser realizadas por diferentes estratégias de engenharia genética como por vetores de DNA (plasmídeos ou virais, por exemplo), porém não existe nenhuma em estágio comercial nem para humanos nem para animais.⁵⁹ O desenvolvimento destas depende de fatores como a escolha da parte estrutural, como produzir em larga escala, processos de purificação e controle da vacina. Com relação a estrutura, as neurotoxinas têm um arranjo semelhante, são compostas pelas cadeias leve (L) e pesada (H), ligadas por uma ponte de dissulfeto.

Apesar disso, existe certa heterogeneidade entre as neurotoxinas, o que faz com que as vacinas sejam específicas para cada sorotipo.⁶⁰ Os protótipos de vacinas de neurotoxinas do tipo C e D são baseados em H, que contém a porção C-terminal (HC), o qual é responsável por se ligar ao receptor.²⁹

Webb et al.⁶⁰, estudaram a resposta de camundongos as vacinas recombinantes de rBoNT/C Hc e rBoNT/D HC, construídas por expressão em *Pichia pastoris* tanto nas formulações monovalentes como bivalentes, a fim de verificar as diferentes ações protetoras de cada uma. Com uma amostra de camundongos, o experimento consistiu em vacinar um grupo com as

recombinantes e outro com controle e algumas semanas depois ambos os grupos foram desafiados com a inoculação das neurotoxinas puras.

Após o procedimento foram feitos testes de quantificação dos antígenos por ELISA. No resultado obtiveram alguns problemas quanto a purificação da proteína de BoNT/C1 Hc, que permaneceu com uma cadeia adicional de 22 aminoácidos e BoNT/D Hc, a qual também continuou com uma parte truncada. Apesar disso, concluíram que as vacinas monovalentes de rBoNT/C Hc e rBoNT/D Hc foram efetivas contra as toxinas C e D, e, além disso, houve total proteção nos camundongos vacinados pela combinação bivalente, validando a eficácia das formulações.

Moreira⁶¹ discutiu possíveis opções de expressão de antígenos contra o botulismo, pela análise de HC expresso por *Escherichia coli* e *P. pastoris*, observando os critérios de cada um para determinar a viabilidade de uma produção em larga escala.

Nos casos de expressão por *E. coli*, os produtos poderiam ser de dois estados da proteína, na forma solúvel ou insolúvel. As solúveis teriam preferência por serem mais imunogênicas, apesar de requererem uma purificação mais intensa. A proteína recombinante então seria purificada por cromatografia de afinidade e, como algumas espécies apresentaram baixa imunização pela dose de antígeno, poderiam ser adicionados adjuvantes, preferencialmente hidróxido de alumínio, já que vacinas com adjuvantes oleosos poderiam ter efeitos adversos com resposta inflamatória.

Agora, comparando a expressão por *P. pastoris*, houve produção de proteínas solúveis, com o porém da dificuldade na lise da célula, encarecendo uma produção em larga escala. Portanto, a expressão por *E. coli* se mostrou mais vantajosa pelo menor custo e porque ambas necessitam de etapas de purificação.

No Brasil, Cunha et al⁵¹ desenvolveram uma quimera recombinante com a cadeia pesada Hc de BoNT combinada a porção termolábil de enterotoxina B de *E. coli*, adicionada a hidróxido de alumínio como adjuvante. Uma amostra de 21

bois *Nelore* foi dividida em três grupos, o primeiro imunizado com a vacina recombinante, o segundo com a vacina comercial bivalente dos toxoides do tipo C e D, e finalmente, o terceiro grupo com o controle de solução salina.

A prova de soro neutralização demonstrou que os títulos da vacina quimera foram de 5 e 6 UI/mL contra os sorotipos C e D, respectivamente, pouco acima dos títulos das vacinas comerciais (5 +-0 e 2.85 +- 1.35 UI/mL) e a quantidade de anticorpos produzida foi semelhante entre os grupos vacinados com a recombinante e a comercial. Concluindo-se que os exemplos de vacinas recombinantes podem ser efetivas contra o botulismo (sorotipos C e D, no caso de animais) e diminuir os riscos de biossegurança e outros problemas dos métodos tradicionais.⁵¹

As vacinas comerciais contra o *C. perfringens* são uma combinação das toxinas ETX, CPA e CPB na forma de toxoides ou toxoides e massa bacteriana, polivalentes, apenas no campo veterinário, já que não existem vacinas aprovadas para humanos. A imunização evita as doenças mais comuns ocasionadas por este, como a gangrena gasosa e Enterotoxemias.¹⁰ A produção da vacina começa pelo crescimento dos diferentes microrganismos (*C. perfringens* do tipo B, C e D), como os demais, as toxinas são inativadas por formaldeído e a imunização ocorre geralmente em mais de uma dose. Os lotes passam então por teste de controle de pureza, toxicidade e eficácia.^{62 10}

Não existe ainda nenhum protótipo ou vacina comercial contra as toxinas ITX, CPE ou A NetB, porém cresce a quantidade de pesquisas sobre possíveis candidatos de vacinas recombinantes de uma ou mais toxinas, principalmente no que se refere a ETX. Embora os métodos de produção das vacinas tradicionais obtenham o nível de anticorpos desejado, há desvantagens como grandes diferenças entre as potências dos lotes produzidos, riscos relacionados a biossegurança e resíduos do processo que possam permanecer no produto final.⁶³

Em 2016, Moreira et al⁶⁴ elaborou uma formulação trivalente de vacina recombinante contra as toxinas alfa, beta e épsilon de *C. perfringens*. A expressão

foi realizada em *Escherichia coli* BL21, onde os antígenos de rAlfa, rBeta e rÉpsilon foram purificados e adicionados a hidróxido de alumínio como adjuvante. As medidas de soro neutralização apresentaram resultados acima do esperado, com títulos maiores em relação ao mínimo pretendido pela legislação e em relação as vacinas comerciais, além da quantidade superior de anticorpos. A imunização foi feita em esquema de duas doses em coelhos e posteriormente os pesquisadores imunizaram outras espécies de bovinos, ovinos e caprinos, os quais também reforçaram os resultados posteriores, com títulos de 1.19, 3.71 e 10.74 UI/mL para as toxinas alfa, beta e épsilon, respectivamente, no caso dos bovinos.⁶⁴

O uso de vacinas recombinantes a partir de *E. coli* tem como vantagens não necessitar de um processo de produção tão trabalhoso em relação ao *C. perfringens*, a não necessidade de inativação das toxinas por formaldeído, o qual pode deixar resíduos no produto final, fora o menor risco com biossegurança relacionado ao *C. perfringens*. Contudo, não significa que vacinas recombinantes por *E. coli* possam ser implementadas na indústria veterinária, já que deve-se analisar o custo benefício, por precisar de tecnologias muitas vezes específicas para purificação dos antígenos, ainda, a produção se limita a alguns antígenos, diferente da tradicional, que pode conter vários em uma formulação.⁶³

Na literatura mais recente em 2017 e 2019, o grupo de Alimolaei⁶⁵ e Wilde⁶⁶ respectivamente, apresentaram dois diferentes estudos sobre vacinas contra *C. perfringens*, particularmente contra enterite necrótica, por dois diferentes meios de liberação, um por um probiótico *Lactobacillus casei* e o segundo por *Salmonella*.

No primeiro, criaram uma cepa recombinante de *L. casei* que expressava o alfa toxoide e esta, então, foi inoculada em camundongos BALB/c por via oral, estes depois colocados em contato com a toxina alfa. O resultado observado foi maior taxa de sobrevivência entre os animais vacinados em comparação ao grupo controle e a confirmação da resposta imune na mucosa. O uso de *L. casei* como

vetor teria como vantagens sua segurança, ação adjuvante e a necessidade de menos doses na imunização.

No experimento de Wilde, a estratégia foi utilizar uma vacina atenuada de *Salmonella* que carregasse três antígenos, sendo a alfa toxina, a NetB (ambos baseados em *C. perfringens*) e uma enzima metabólica, a frutose-1,6-bifosfato aldolase (Fba), a qual demonstrou ter relação na virulência. A imunização foi em frangos de um dia de idade, em grupos do tipo *Cornish* e *Rock*, livres de *Salmonella*, separados entre os que foram inoculados por via oral com a vacina e o grupo controle. O desafio foi induzir as aves a enterite necrótica por uma cepa virulenta de *C. perfringens* na ração. Os resultados mostraram que o modelo de lise de *Salmonella* para liberação dos antígenos gerou boa resposta imunológica, com produção de anticorpos na mucosa e resposta celular.^{65 66}

Finalmente, o processo de produção das vacinas, sejam elas por métodos convencionais ou não, deve ser regulamentado e licenciado pelas agências responsáveis.¹⁸ No Brasil, a agência que regulamenta vacinas veterinárias é o Ministério da Agricultura, de Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual determina por instruções normativas todos os testes a serem realizados para cada tipo de formulação, como os testes de título e anticorpos.

Ainda, as vacinas passam por um controle de qualidade rígido e devem seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

6. CONCLUSÃO(ÕES)

No ramo das vacinas contra clostridioses, ainda há muito o que se melhorar, principalmente referente a novos métodos de desenvolvimento e produção, já que a maioria dos agentes têm riscos de biossegurança na fabricação e grandes diferenças entre lotes, representando desvantagens do processo tradicional.

Como demonstrado, as vacinas recombinantes e novos métodos de liberação são possíveis oportunidades de transpor essas limitações. Ainda podem

ter como vantagem requerer menos métodos de "downstream", ou seja, das fases de purificação do antígeno, uma vez que a produção por recombinantes conhecidas como *E. coli* ou *P. pastoris* conseguem um nível de antígeno purificado melhor em relação ao tradicional e também têm uma quantidade de produção estabelecida.

No entanto, os métodos tradicionais ainda são eficazes e de bom custo-benefício, enquanto que as vacinas recombinantes podem encarecer o custo de uma produção em larga escala, porque exigem tecnologias mais caras. Ainda assim, inovações surgiram nas últimas décadas, como a proposta de vacinas de liberação controlada por meio de probióticos, no protótipo de *L. casei* para liberação de alfa toxina do *C. perfringens*, as quais podem ser interessantes pela fácil administração (pela alimentação ou via nasal) e efetividade na produção de anticorpos.

Na situação atual, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carnes, dependendo da agropecuária para o crescimento da economia. As clostridioses causam perdas financeiras consideráveis nessa área e podem ser evitadas por medidas simples de manejo e vacinação. Por consequência, é primordial entender a patogênese destas doenças e conhecer a produção das vacinas comerciais, a fim de planejar melhorias no desenvolvimento de vacinas mais efetivas, de custo acessível e que sigam os critérios de legislação.

7. BIBLIOGRAFIA

1. JORGENSEN, James H. **Manual of clinical microbiology**. 2004
2. DÜRRE, Peter (Ed.). **Handbook on clostridia**. CRC press, 2005.
3. MACZULAK, Anne. **Encyclopedia of Microbiology (Facts on File Science Library)**. Facts on file, 2011.
4. SAMUEL, Baron. Medical microbiology. **The University of Texas Medical Branch at Galveston–Tx, USA**, 1996.
5. LOBATO, Francisco Carlos Faria; ASSIS, Ronnie Antunes de. Clostridioses dos animais. **II Simpósio Mineiro de Buriatria**, 2005.
6. BIER, Otto G. et al. **Fundamentals of immunology**. Springer Science & Business Media, 2012.
7. LOBATO, Francisco Carlos Faria et al. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 29-48, 2013.
8. UZAL, Francisco Alejandro et al. (Ed.). **Clostridial diseases of animals**. Wiley Blackwell, 2016.
9. WOULDSTRA, Cédric et al. Investigation of Clostridium botulinum group III's mobilome content. **Anaerobe**, v. 49, p. 71-77, 2018.
10. ZARAGOZA, Nicolas E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 525, 2019.
11. VILEI, Edy M. et al. Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from Clostridium chauvoei. **Veterinary research**, v. 42, n. 1, p. 2, 2011.
12. SRIVASTAVA, Ira et al. Spontaneous C. septicum gas gangrene: a literature review. **Anaerobe**, v. 48, p. 165-171, 2017.
13. GAZIOGLU, Abdullah et al. Sudden death due to gas gangrene caused by Clostridium septicum in goats. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 406, 2018.

14. UZAL, Francisco A. et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. **Future microbiology**, v. 9, n. 3, p. 361-377, 2014.
15. WADE, Ben et al. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. **Veterinary microbiology**, v. 197, p. 53-61, 2016.
16. Vacinação contra clostridioses - Disponível em: <<https://www.ourofinosaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/vacinacao-contraclostridioses/>> Acesso em Ago.2020.
17. CHALMERS, W. S. K. Overview of new vaccines and technologies. **Veterinary microbiology**, v. 117, n. 1, p. 25-31, 2006.
18. DEMPSTER, Robert. The manufacture of veterinary clostridial vaccines. **Microbiology Australia**, v. 36, n. 3, p. 120-121, 2015.
19. RASHID, A. et al. Risks of vaccination: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 19-27, 2009.
20. Live Animals-Production of Cattle in World-Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/data/QA/visualize>> Acesso em Jul.2020
21. Abastecimento d. A. P. eBM. **Instrução normativa no 50**, de 24 de setembro de 2013. 2013.
22. RASETTI-ESCARGUEIL, Christine; LEMICHEZ, Emmanuel; POPOFF, Michel R. Public health risk associated with botulism as foodborne zoonoses. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 17, 2020.
23. CHELLAPANDI, Paulchamy; PRISILLA, Arokiyasamy. Structure, function and evolution of *Clostridium botulinum* C2 and C3 toxins: Insight to poultry and veterinary vaccines. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 5, p. 412-424, 2017.
24. SILVA, Rodrigo Otávio Silveira et al. Botulism in ruminants in Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1411-1417, 2016.

25. ROOD, Julian I. et al. (Ed.). **The clostridia: molecular biology and pathogenesis**. Academic Press, 1997.
26. CRITCHLEY, E. M. R. A comparison of human and animal botulism: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 84, n. 5, p. 295-298, 1991.
27. QUEVEDO, Pedro de Souza. Clostridioses em ruminantes revisão. **R. cient. eletr. Med. Vet.**, p. 1-16, 2015.
28. SURANA, Sunaina et al. The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. **Toxicon**, v. 147, p. 58-67, 2018.
29. SUNDEEN, Grace; BARBIERI, Joseph T. Vaccines against botulism. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 268, 2017.
30. POPOFF, Michel R.; BOUVET, Philippe. Clostridial toxins. **Future microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1021-1064, 2009.
31. VAN GALEN, Gaby et al. Retrospective evaluation of 155 adult equids and 21 foals with tetanus in Western, Northern, and Central Europe (2000–2014). Part 1: Description of history and clinical evolution. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 27, n. 6, p. 684-696, 2017.
32. ARONOFF, David M. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: mechanisms of disease. **Anaerobe**, v. 24, p. 98-101, 2013.
33. NICHOLSON, Pamela et al. Production of neutralizing antibodies against the secreted Clostridium chauvoei toxin A (CctA) upon blackleg vaccination. **Anaerobe**, v. 56, p. 78-87, 2019.
34. UZAL, Francisco A. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against Clostridium chauvoei infection in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 71-77, 2012.
35. FREY, Joachim; FALQUET, Laurent. Patho-genetics of Clostridium chauvoei. **Research in microbiology**, v. 166, n. 4, p. 384-392, 2015.
36. HECKLER, Rubiane F. et al. Blackleg in cattle in the state Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 6-14, 2018.

37. NAMPANYA, Sonevilay et al. Financial impact of an outbreak of clinically diagnosed blackleg—a case study from Lao PDR. **Veterinary Medicine and Science**, v. 5, n. 2, p. 118-128, 2019.
38. AYELE, Birhanu; TIGRE, Worku; DERESSA, Benti. Epidemiology and financial loss estimation of blackleg on smallholder cattle herders in Kembata Tambaro zone, Southern Ethiopia. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1822, 2016.
39. GROSETH, P. K. et al. Large outbreak of blackleg in housed cattle. **Veterinary Record**, v. 169, n. 13, p. 339-339, 2011.
40. SONGER, J. Glenn. Clostridium novyi (myonecrosis, black disease, and bacillary hemoglobinuria) and Clostridium septicum (braxy) infections. In: **Food Animal Practice**. WB Saunders, 2009. p. 58-61.
41. HJERPE, Charles A. Bacillary Hemoglobinuria (Clostridium hemolyticum) and Infectious Necrotic Hepatitis (Clostridium novyi, Type B) Bacterins. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 6, n. 1, p. 228-229, 1990.
42. HAUER, Paul J.; YEARY, Teresa J.; ROSENBUSCH, Ricardo F. Evidence of the protective immunogenicity of native and recombinant Clostridium haemolyticum phospholipase C (beta toxin) in guinea pigs. **Vaccine**, v. 24, n. 2, p. 124-132, 2006.
43. UZAL, Francisco A. et al. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. **Anaerobe**, v. 53, p. 11-20, 2018.
44. VERHERSTRAETEN, Stefanie et al. The synergistic necrohemorrhagic action of Clostridium perfringens perfringolysin and alpha toxin in the bovine intestine and against bovine endothelial cells. **Veterinary research**, v. 44, n. 1, p. 45, 2013.
45. GOOSSENS, Evy et al. Clostridium perfringens strains from bovine enterotoxemia cases are not superior in in vitro production of alpha toxin, perfringolysin O and proteolytic enzymes. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 32, 2014.

46. NAVARRO, Mauricio A.; MCCLANE, Bruce A.; UZAL, Francisco A. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 212, 2018.
47. TWETEN, Rodney K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. **Veterinary microbiology**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2001.
48. MCVEY, Scott; SHI, Jishu. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, n. 3, p. 381-392, 2010.
49. ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and molecular immunology E-book**. Elsevier Health Sciences, 2014.
50. JORGE, Sérgio; DELLAGOSTIN, Odir Antônio. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 6-13, 2017.
51. CUNHA, Carlos EP et al. Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. **Vaccine**, v. 32, n. 2, p. 214-216, 2014.
52. WALKER, P. D. Bacterial vaccines: old and new, veterinary and medical. **Vaccine**, v. 10, n. 14, p. 977-990, 1992.
53. BROWN, J. Edward; WILLIAMSON, E. Diane. Molecular approaches to novel vaccines for the control of clostridial toxemias and infections. In: **The Clostridia**. Academic Press, 1997. p. 505-524.
54. SIVAKUMAR, S. M. et al. Vaccine adjuvants—current status and prospects on controlled release adjuvancity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 197-206, 2011.
55. GARÇON, Nathalie; FRIEDE, Martin. Evolution of adjuvants across the centuries. In: **Plotkin's Vaccines**. Elsevier, 2018. p. 61-74. e4.

56. ELLIS, Ronald W.; RAPPUOLI, Rino; AHMED, Sohail. Technologies for making new vaccines. In: **Vaccines**. WB Saunders, 2013. p. 1182-1199.
57. TOBÍO, María et al. A novel system based on a poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 5, p. 682-688, 1999.
58. JIANG, Wenlei; SCHWENDEMAN, Steven P. Stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 5, p. 808-817, 2008.
59. PRZEDPELSKI, Amanda et al. Enhancing toxin-based vaccines against botulism. **Vaccine**, v. 36, n. 6, p. 827-832, 2018.
60. WEBB, Robert P. et al. Protection with recombinant Clostridium botulinum C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4273-4282, 2007.
61. MOREIRA, G. M. S. G. et al. Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. **Anaerobe**, v. 28, p. 130-136, 2014.
62. TITBALL, Richard W. Clostridium perfringens vaccines. **Vaccine**, v. 27, p. D44-D47, 2009.
63. FERREIRA, Marcos Roberto A. et al. Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of Clostridium perfringens: production strategies and applications as veterinary vaccines. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 340, 2016.
64. MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia et al. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against Clostridium perfringens alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.
65. ALIMOLAEI, Mojtaba et al. A Recombinant Probiotic, Lactobacillus casei, Expressing the Clostridium perfringens α -toxoid, as an Orally Vaccine Candidate Against Gas Gangrene and Necrotic Enteritis. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 2, p. 251-257, 2018.

66. WILDE, Shyra et al. Salmonella-vectored vaccine delivering three *Clostridium perfringens* antigens protects poultry against necrotic enteritis. **PloS one**, v. 14, n. 2, p. e0197721, 2019.
67. WOULDSTRA, Cedric et al. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3120-3127, 2012.

8. ANEXOS

Caroline M. Santos 03/11/2020

Data e assinatura do aluno(a)

Mauro Antonio Stefane SP, 04/11/2020

Data e assinatura do orientador(a)