

Avaliação de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B

[Evaluation of vaccines against *Clostridium novyi* type B]

R.A.P. Nascimento¹, F.C.F. Lobato², V.L.V. Abreu², N.E. Martins², R.A. Assis², M.B. Carvalho Filho¹

¹Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MG
Caixa Postal 50
33600-000 - Pedro Leopoldo, MG

²Escola de Veterinária da UFMG- Belo Horizonte

RESUMO

Avaliou-se a eficiência de 13 vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *Clostridium novyi* tipo B, pela titulação de antitoxina alfa em soro de coelhos e de bovinos vacinados e pelo teste de desafio direto em cobaias. As vacinas codificadas como T1 e T10 apresentaram, em coelhos, títulos de antitoxina alfa de 8 e 12UI/ml respectivamente, superiores ao nível mínimo de teste de 3,5UI/ml, recomendado para controle desse produto, e as vacinas T2 e T5, títulos de 2 e 3UI/ml, respectivamente. As vacinas T1, T2, T5 e T10 apresentaram níveis de antitoxina alfa detectáveis em bovinos, mas somente T1 e T10 induziram títulos compatíveis com o nível de teste. Pelo método de desafio direto em cobaias, as vacinas T1, T2, T5, T10 e T11 atenderam aos requisitos, protegendo todos os animais desafiados. Em sua maioria, as vacinas comercializadas no Brasil contra *Clostridium novyi* tipo B foram ineficientes em estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado para controle desse produto.

Palavras-chave: vacina, toxina, *Clostridium novyi* tipo B, hepatite necrótica infecciosa, clostridiose

ABSTRACT

The antibody response to the *Clostridium novyi* type B alfa toxin component of 13 commercial vaccines (T1 to T13) and a standard toxoid was evaluated by the serum neutralization test with rabbit and cattle sera and by direct challenge of vaccinated guinea pig. T1 and T10 induced titles of *C. novyi* type B alfa antitoxin in rabbits, superior to the recommended minimum title of 3.5 IU/ml, namely of 8 and 12 IU/ml, respectively. T2 and T5 induced titles of 2 and 3 IU/ml, respectively. These, plus T1 and T10, were also the only vaccines which produced detectable antitoxin in bovine sera. T1, T2, T5 and T10, plus T11, were able to protect all the vaccinated guinea pigs at the challenge. Most of *C. novyi* type B vaccines in Brazil was unable to induce the minimum antibody response recommended for approval of the product.

Keywords: vaccine, toxin, *Clostridium novyi* type B, infectious necrotic hepatitis, clostridiosis

INTRODUÇÃO

Clostridium novyi tipo B faz parte do quadro dos agentes etiológicos responsáveis pelas clostridioses. Como todo *Clostridia*, é ubiqüitário, tem a propriedade de permanecer por longo período no solo na forma de esporos, e ao

encontrar condições favoráveis, prolifera rapidamente e produz toxinas. *Clostridium novyi* tipo B é o agente da hepatite necrótica, também conhecida como moléstia negra dos ovinos. Nas regiões endêmicas, esporos podem estar presentes no fígado dos animais, principalmente de ovinos. Lesões focais no fígado, causadas por

migração de formas imaturas de trematódeos hepáticos e pelo uso de quimioterápicos, favorecendo a germinação dos esporos e produção de toxinas, têm sido relatadas como prováveis fatores desencadeadores da hepatite necrótica (Uzal et al., 1996; Robles et al., 2000). *Clostridium novyi* tipo B está, também, associado à morte súbita (Sterne, Batty, 1978). Existem poucos relatos desse agente no Brasil. Apesar da elevada ocorrência de focos e de animais suspeitos de clostridioses, a maioria dos diagnósticos baseia-se em dados clínicos. Baldassi (1986) isolou bactérias do gênero *Clostridium*, de 118 amostras de espécimes clínicos de fígado, conteúdo ruminal e fezes. Seis foram classificadas por provas bioquímicas como *Clostridium novyi*, sem determinação do tipo envolvido.

A utilização de imunógenos tem reduzido, em grande parte, a mortalidade e conseqüentes perdas econômicas relacionadas às clostridioses. As vacinas comercializadas no Brasil são compostas de múltiplos antígenos. As normas para controle das vacinas estão definidas na legislação do Ministério de Agricultura e Abastecimento (MAPA; Brasil, 1997). Em relação ao *Clostridium novyi* tipo B, exige-se nível mínimo de antitoxina alfa de 3,5UI/ml,

determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos, pela titulação de soros de coelhos vacinados (Brasil, 1997).

Na década de 90 a produção de 1 bilhão 193 milhões de doses de vacinas polivalentes contra clostridioses comprova sua grande utilização.

Entretanto, apenas as vacinas contra *Clostridium chauvoei* e *Clostridium botulinum* são submetidas a controle oficial de potência. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de 13 vacinas polivalentes que continham em sua composição *Clostridium novyi* tipo B, disponíveis para comercialização no mercado brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando-se técnicas sorológicas e desafio direto, foram testadas 13 vacinas de 11 laboratórios (Tab. 1), que no ano de 2001 comercializaram no Brasil vacinas polivalentes que continham *Clostridium novyi* tipo B. Como grupos-controle foram utilizados um toxóide padrão e uma bacterina-toxóide padrão, fornecidos pelo Agriculture Animal Plant Health Inspection Service (APHIS).

Tabela 1. Codificação e composição dos padrões analisados e de vacinas comercializadas no Brasil

Vacina	Composição
T 1	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos C e D
T 2	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. novyi</i> tipo B; <i>C. perfringens</i> tipos C e D
T 3	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos C e D
T 4	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D; <i>C. novyi</i> ; <i>C. botulinum</i> tipos C e D; <i>C. sordellii</i>
T 5	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos A, B, C e D; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. haemolyticum</i>
T 6	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos B e D
T 7	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos C e D
T 8	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> tipo B; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D
T 9	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D; <i>C. novyi</i>
T 10	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. sordellii</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos C e D
T 11	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. perfringens</i>
T 12	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. novyi</i> ; <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D; <i>C. sordellii</i>
T 13	<i>C. chauvoei</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. botulinum</i> tipos C e D; <i>C. perfringens</i> tipos B, C e D; <i>C. novyi</i> ; <i>C. sordellii</i>
IRP-207	Bacterina toxóide padrão
IRP-249	Toxóide padrão

IRP: Internal Reference Protocol.

Na avaliação sorológica, para cada imunógeno foram utilizados 10 coelhos adultos e seis bovinos com idade entre sete e oito meses. Os

coelhos foram vacinados nos dias zero e 21 com metade da dose recomendada para bovinos. Os animais foram sangrados no 35º dia após a

primo-vacinação e os soros foram misturados em partes iguais, constituindo-se um *pool* para cada grupo (Brasil, 1997). Os bovinos, sem histórico de vacinação contra *Clostridium novyi* tipo B e negativos ao teste de soroproteção em camundongos (Tammemagy, Grant, 1967), foram vacinados com a dose recomendada para a espécie, com reforço aos 42 dias e sangrados nos dias 42 e 56. Em cada sangria, os soros dos seis bovinos foram misturados em partes iguais, constituindo-se um “pool” para cada grupo. Nos grupos testemunhas a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85%. Todos os soros foram mantidos a -20°C até a realização dos testes.

Os *pools* dos soros dos coelhos e dos bovinos foram submetidos a uma triagem, pela técnica de soroproteção em camundongos, frente a 2,5DL₅₀ de toxina alfa (Tammemagy, Grant, 1967). Os soros que protegeram os camundongos foram titulados pelo método de soroneutralização em camundongos (Brasil, 1997), empregando nível de teste de L+/100. Como controle dos testes foi utilizada antitoxina alfa padrão (IRP 298) contendo 490UI/ml.

Na avaliação por desafio direto, para cada imunógeno foram utilizados dois grupos (I e II) de oito cobaias. Nos grupos-controle, com cinco cobaias cada, a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85%. Os animais, vacinados com 1/5 da dose recomendada para bovinos nos dias zero e 21, foram desafiados com 100 DL₅₀ de suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B no dia 35. As cobaias do grupo I foram desafiadas com suspensão de esporos padrão (IRP 307) e as do grupo II com suspensão de esporos produzida para o experimento. As cobaias inoculadas foram observadas por 72 horas, registrando-se as mortes ocorridas (Estados Unidos, 1991).

Para produção da toxina alfa, a amostra de referência de *Clostridium novyi* tipo B (ATCC¹ 25758) foi cultivada em meio de Cardella (Cardella et al., 1958), em atmosfera de anaerobiose à 37°C por 18 horas. A cultura obtida foi centrifugada a 8000 x g por 30 minutos e o sobrenadante concentrado por ultrafiltração com membrana de retenção de 10 KDa². A toxina foi padronizada ao nível de teste de L+/100 (Estados

Unidos, 2002). A dosagem de proteína foi realizada pelo método de biureto, comparado a curva padrão de soroalbumina bovina pela leitura em densidade ótica a 690nm de absorbância em espectrofotômetro. Os esporos foram produzidos a partir da amostra de *Clostridium novyi* tipo B (ATCC 25758), de acordo com a técnica descrita por Kolbe et al. (1981). A titulação da suspensão de esporos em DL₅₀ foi realizada pelo método de Reed e Muench (1938).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização da toxina frente a 0,1UI/ml de antitoxina alfa padrão foi de 5L+/100, com título de 20DL₅₀ e 0,13mg de proteína para cada L+/100, superiores aos níveis mínimos exigidos pelo MAPA de 10DL₅₀ e 0,05mg de proteína. (Brasil, 1997).

Os resultados do teste de eficiência dos imunógenos comerciais, expresso em UI/ml de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B nos *pools* dos soros de coelhos, positivos ao teste de soroproteção, são apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B em “pool” de soros de coelhos¹ coletados aos 14 dias, após a segunda vacinação² com imunógenos comerciais e toxóide padrão

Vacina	Antitoxina alfa (UI/ml)
T1	8
T2	2
T5	3
T10	12
IRP 249 (toxóide padrão)	15

¹Positivos ao teste de soroproteção em camundongos.

²Vacinados nos dias 0 e 21.

As vacinas T1 e T10 induziram respostas de antitoxina alfa de 8UI/ml e 12UI/ml, respectivamente, e o toxóide padrão IRP 249 de 15UI/ml, superiores ao nível mínimo de 3,5UI/ml exigido pelo MAPA para aprovação de vacina contra *Clostridium novyi* tipo B (Brasil, 1997). As vacinas T2 e T5 apresentaram níveis de 2UI/ml e 3UI/ml respectivamente, abaixo do nível exigido pela legislação brasileira, mas superior ao nível mínimo de 0,5UI/ml exigido pelo Code of Federal Regulations (Estados Unidos, 2002). O Brasil adota, para vacinas

¹ ATCC - American Type Culture Collection

² Amicon-Milipore Corporation, USA.

contra clostridioses, os parâmetros preconizados pela British... (1985), ratificados pela European... (1998).

Os *pools* de soros dos bovinos vacinados com T1, T2, T5 e T10, positivos ao teste de soroproteção, foram submetidos à prova de soroneutralização em camundongos e os títulos de antitoxina alfa são apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Títulos de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B em *pool* de soros de bovinos¹ coletados aos 42 e 56 dias após a primeira vacinação com imunógenos comerciais, sendo a última coleta feita 14 dias após a segunda vacinação

Vacina	Antitoxina alfa (UI/ml)	
	Dia 42 ²	Dia 56 ³
T1	0,1	4,0
T2	0,1	2,0
T5	0,1	2,0
T10	0,1	5,0

¹ Positivos ao teste de soro proteção em camundongos. ² Segunda dose de vacina. ³ 14 dias após a segunda vacinação.

As vacinas T1, T2, T5 e T10 induziram títulos em coelhos e bovinos (Tab. 1 e 2) e os resultados demonstraram ser a resposta em coelhos superior à obtida em bovinos.

A titulação dos soros dos bovinos, após a segunda dose da vacina (Tab. 2) confirma a necessidade da dose de reforço para se estabelecer imunidade adequada para *Clostridium novyi* tipo B, conforme demonstrado por Kerry e Graig (1979). Resultados semelhantes foram observados por Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000) em vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D.

Macheak et al. (1972) demonstraram, em ovinos, que o título de 1,6UI/ml de antitoxina alfa confere proteção ao desafio com suspensão de esporos de *Clostridium novyi* tipo B. Brown et al. (1976) estabeleceram que os níveis protetores para ovinos são os mesmos dos bovinos e Harbola e Verma (1988) demonstraram, em ovinos, 0,4UI/ml de antitoxina alfa como nível mínimo de proteção. Baseando-se nos resultados destes autores, poder-se-ia inferir que os títulos de 2,0UI/ml induzidos pelas vacinas T2 e T5 (Tab. 3) seriam suficientes para proteger bovinos e ovinos.

A utilização do teste de soroproteção em camundongos para triagem dos soros dos coelhos e bovinos permitiu uma redução significativa no número de animais de laboratório utilizados no experimento. Pela mesma razão, esse teste também foi empregado por Lobato (1989), Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000).

A titulação da suspensão de esporos produzida e da suspensão padrão IRP 307 foi de 10^4 DL₅₀ e $2,4 \times 10^4$ DL₅₀, respectivamente. O nível empregado nos testes foi de 1×10^2 DL₅₀. A suspensão de esporos glicerina mantida a -70°C mostrou-se estável durante a realização do experimento, sendo avaliada por um período de seis meses.

Os resultados obtidos no teste de desafio direto em cobaias para os grupos I e II são apresentados na Tab. 4.

Tabela 4. Teste de eficiência de vacinas que continham em sua composição *Clostridium novyi* tipo B em cobaias vacinadas e desafiadas com 100 DL₅₀ com suspensão de esporos por via intramuscular

Vacina	Grupo I ¹	Grupo II ²
	Vivos/total	Vivos/total
T1	8/8	8/8
T2	8/8	8/8
T3	0/8	0/8
T4	0/8	0/8
T5	8/8	8/8
T6	0/8	0/8
T7	0/8	0/8
T8	0/8	0/8
T9	0/8	0/8
T10	8/8	8/8
T11	8/8	8/8
T12	0/8	0/8
T13	0/8	0/8
IRP 207 Bacterina padrão	8/8	8/8
Testemunha (salina 0,85%)	0/5	0/5

¹ Desafio com 1×10^2 de suspensão de esporos padrão IRP 307.

² Desafio com 1×10^2 de suspensão de esporos produzida.

Os resultados com o desafio direto em cobaias e os testes de detecção de antitoxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B mostram que as vacinas T1, T2, T5 e T10, que induziram resposta imunológica em coelhos e bovinos, também protegeram as cobaias frente ao desafio com suspensão de esporos. A vacina T11 protegeu as cobaias no teste de desafio direto, mas não induziu nível de antitoxina alfa detectável nos

coelhos e bovinos, sugerindo tratar-se de uma bacterina. A inclusão do teste de desafio direto em cobaias, neste trabalho, está diretamente relacionada à falta de informação nos rótulos das vacinas analisadas, os quais, em sua maioria, indicam apenas tratar-se de vacina inativada.

Considerando que os efeitos sobre o organismo causado pelo *Clostridium novyi* tipo B estão relacionados à ação direta da toxina alfa, um toxóide deverá ser preferencialmente indicado para prevenção.

Na última década, foram lançadas vacinas com maior número de componentes clostridiais. Das 13 vacinas analisadas, apenas quatro foram registradas entre 1980 e 1990; as outras nove obtiveram o registro a partir de 1995 (Sindan, 2003). Provavelmente, a apressada competição por um mercado emergente leve os laboratórios produtores a lançarem novas vacinas polivalentes contra clostridioses, mesmo na ausência de diagnóstico e estudos epidemiológicos de prevalência dos agentes que compõem essas vacinas.

O controle oficial das vacinas contra *Clostridium chauvoei* implantado no Laboratório Regional de Apoio Animal do MAPA-RS (LARA/RS) e das vacinas contra *Clostridium botulinum* C e D, no Laboratório Regional de Apoio Animal do MAPA-MG (LARA/MG), em 1994, permitiu maior rigor na garantia da qualidade desses produtos. Os resultados obtidos por Lobato (1989), ao avaliar vacinas comerciais contra botulismo, contribuíram, decisivamente, para a implantação do controle oficial desse imunógeno (Mota, P.M.P.C. informação verbal)³.

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 e 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.

³ Laboratório Regional de Apoio Animal, LARA MG, Cx P. 50, 33600-000, Pedro Leopoldo-MG

O trabalho conduzido por Lobato (1989), que estudou vacinas contra botulismo, as avaliações de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D realizadas por Azevedo et al. (1998) e Lobato et al. (2000), a avaliação de vacinas contra *Clostridium sordellii* por Balsamão (2001) e o presente experimento com *Clostridium novyi* tipo B demonstraram que, em sua maioria, as vacinas contra clostridioses não induzem respostas imunes adequadas contra os agentes das enfermidades que informam prevenir.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo somam-se aos já relatados e indicam a necessidade urgente de controle efetivo das vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, p.239-242, 1998.
- BALDASSI, L. *Isolamento de bactérias do gênero Clostridium e detecção de toxina botulínica a partir de materiais obtidos de bovinos com suspeita clínica de botulismo*. 1986. 59f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BALSAMÃO, G.M. *Teste de potência para Clostridium sordellii em vacinas comerciais contra clostridioses*. 2001. 25f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRASIL. Lei nº 8.078, 11 de setembro de 1990. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de setembro de 1990. Suplemento nº 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, p.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, p.10168-10169.

- BRITISH Pharmacopeia (VETERINARY). Veterinary Vaccines. Department of Health and Social Security, Medicines Commission. Reino Unido. 1985.
- BROWN, K.K.; PARIZEK, R.E.; STEWART, R.C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.12, p.1717-1720, 1976.
- CARDELLA, M.A.; DUFF, J.T.; GOTTFRIED, C. et al. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.*, v.75, p.360-365, 1958.
- ESTADOS UNIDOS. *Code of Federal Regulations*. Washington: office of the Federal Register National Archives and Record Administration, *Clostridium novyi* bacterin-toxoid, sec. 113.108, p.517, 1991.
- ESTADOS UNIDOS. *Code of Federal Regulations*. Washington: office of the Federal Register National Archives and Record Administration, sec. 113.108, v.1, 2002. *Clostridium novyi* bacterin-toxoid. Disponível na Internet via [www.URL: http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/janqtr/9cfr113.108.htm](http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/janqtr/9cfr113.108.htm). Acesso em 02 de abril de 2002.
- EUROPEAN Pharmacopeia. 3.ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998. p.167: Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines.
- HARBOLA, P.C.; VERMA, J.G. Immunogenic response to *Clostridium novyi* type B toxóide in guinea pigs and sheep. *Indian Vet. J.*, v.8, p.658-660, 1988.
- KERRY, J.B.; CRAIG, G.R. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. *Vet. Rec.*, v.105, p.551-554, 1979.
- KOLBE, D.R., CLAUS, K.D.; NERVIG, R.M. A method for the production of *Clostridium haemolyticum* spores on solid medium. *J. Biol. Stand.*, v.9, p.115-119, 1981.
- LOBATO F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O. et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.313-318, 2000.
- LOBATO, F.C.F. *Avaliação de imunógenos antibotulínicos em uso no Brasil*. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MACHEAK, M.E.; CLAUS, K.D.; MALOY, S.E. Potency testing *Clostridium novyi* containing bacterins: comparison of immunologic response in guinea pigs and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v.33, p.1201-1208, 1972.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.
- ROBLES, C.A.; KERBAGE, O.K.; MOREIRA, A.R. Hepatitis Infecciosa Necrosante en ovinos Merino de la Patagonia Argentina, parasitados con *Thysanosoma actinioides*. *Arch. Med. Vet.*, v.32, p.125-133, 2000.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Veterinários: Manual de Produtos Veterinários 2003-2004. Robe Editorial, 2001. 1106p.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Clostrídios patógenos*. Zaragoza: Acribia, 1978. 135p.
- TAMMEMAGY, L.; GRANT, K.M. Vaccination in the control bovine botulism in Queensland. *Aust. Vet. J.*, v.43, p.368-373, 1967.
- UZAL, F.A.; OLAECHEA, F.V.; VANNELLI, S.A. Un caso de hepatitis infecciosa necrosante en oveja sin Fasciola hepática. *Rev. Med. Vet.*, v.77, p.377-379, 1996.