

T636.089 69

S729A

2005



Milton Formiga de Souza Júnior

**TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO PARA TOXINA ÉPSILON E TITULAÇÃO DE
TOXINAS BETA E ÉPSILON DE *Clostridium perfringens*
TIPOS C E D EM CULTURA DE CÉLULAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato.
Co-orientadora: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte – MG
UFMG – Escola de Veterinária
2005

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

05/09/06

857606-08

403455

S731t Souza Júnior, Milton Formiga, 1974-

Teste de neutralização para toxina épsilon e titulação de toxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo C e D em cultura de cédulas / Milton Formiga Souza Júnior. -2005.

31 p. :il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. *Clostridium perfringens* – Toxinas – Teses. 2. Enterotoxemia – Teses. 3. Células – Cultura – Teses. 4. Vacinas – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Lobato, Zélia Inês Portela. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título

CDD – 636.089 692

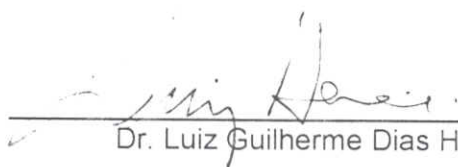
Dissertação defendida e aprovada em 01 de Junho de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
(orientador)



Profa. Zélia Inês Portela Lobato



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu

Dedico esta dissertação a Dionete Soares Formiga, Dinalva Soares Lima, Francisco Lobato e Zélia Inês Portela Lobato.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e Médico Veterinário Nelson Eder Martins;

Aos membros da banca que fizeram parte da avaliação dessa dissertação;

Aos Professores Andrey Pereira Lage e Vera Lúcia Viegas de Abreu.

Ao Colegiado de Pós Graduação do DMVP da UFMG;

Ao LANAGRO/MG, representado pela pessoa do Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, e funcionários;

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Anaeróbios;

Aos funcionários dos setores de Esterilização (especialmente à Creuza), Computação, Microbiologia, Vírus e Cultivo Celular;

Ao Laboratório Vallée pela contribuição ao desenvolvimento desta pesquisa;

À Telma Maria Alves pela enorme paciência, dedicação e profissionalismo;

À nação nordestina pela coragem, perseverança e por representarem parte importante desse País chamado Brasil;

À minha amiga, mãe e apaziguadora Sheila, pela demonstração e paciência, carinho e por ser a pessoa tão especial desse retirante nordestino.

Agradecimentos ao professor Ivan Sampaio pela grande ajuda na idealização do modelo matemático para a construção da equação matemática.

Tudo que nos traz incômodo tem por intenção fazer enfrentar verdades necessárias que nos façam aprimorar definitivamente a nossa vida; entender àquelas que nos rodeiam, e o futuro conseguirá ser novo, e não uma mera repetição de erros de passado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. LITERATURA CONSULTADA	11
2.1. <i>Clostridium perfringens</i>	11
2.2. Toxinas	13
2.2.1. Toxina alfa	13
2.2.2. Toxina beta	13
2.2.3 Toxina épsilon	14
2.2.4. Toxina iota	14
2.3. Diagnóstico de enterotoxemia	14
2.4. Teste de potência de toxóide	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Local do experimento	16
3.2. Animais utilizados	16
3.3. Toxina e anti-toxina padrão	16
3.4. Culturas de células	16
3.4.1. Linhagens celulares	16
3.5. Produção das Toxinas	16
3.5.1. Amostras de <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D	16
3.5.2. Produção de toxina beta e épsilon	17
3.5.3. Determinação e tipificação das toxinas produzidas	17
3.5.4. Titulação das toxinas <i>in vivo</i>	17
3.5.5. Teste de sensibilidade das toxinas beta e épsilon	17
3.6. Elaboração da equação da curva e fórmula matemática	18
3.7. Titulação da épsilon toxina em células MDCK	18
3.8 Teste de potência	18
3.8.1. Linhagem celular e meios soluções e reagentes utilizados	18
3.8.2. Soros testes	18
3.8.3. Padronização da toxina épsilon	18
3.8.4. Teste de potência <i>in vitro</i>	19
3.8.4.1. Análise Estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teste de sensibilidade de linhagens celulares às toxinas beta e épsilon, em DMM/ml	20
Tabela 2.	Titulação de toxina épsilon em células MDCK – valores de D.O. obtidos em 12 repetições de cada concentração	22
Tabela 3.	Estimativa do efeito citopático <i>in vitro</i> baseada nos ensaios <i>in vivo</i> , expressos em DMM, para a pesquisa da toxina épsilon	23
Tabela 4.	Resultado do ensaio para titulação de toxina épsilon em MDCK	23
Tabela 5.	Títulos de toxina épsilon em dose mínima mortal (DMM/ml) e efeito citopático (ECT/ml)	24
Tabela 6.	Título em UI/ml de anti-toxina épsilon em "pool" de soros de coelhos e soro padrão, pela técnica de SN em camundongos e em linhagem de células MDCK.....	26

FIGURA

Figura 1.	Representação das médias dos valores, em DMM, observados nas 12 repetições de cada concentração de toxina épsilon em relação ao FC	22
-----------	--	----

RESUMO

Avaliou-se a sensibilidade das linhagens celulares *Madin darby kidney bovine cells* (MDBK), *Madin darby canine cells* (MDCK), *African green monkey* (VERO), Linfossarcoma de camundongos (L-929), *Embryonic tracheal bovine cells* (EBTr) e *Ovarian hamsters cells* (CHO), às toxinas beta e epsilon de *Clostridium perfringens* tipos C e D respectivamente. Desenvolveram-se e padronizaram-se uma técnica de titulação em linhagem celular e um teste de soroneutralização *in vitro* para toxina epsilon; A L 929 foi a linhagem celular mais sensível à toxina beta e a MDCK à toxina epsilon, nas concentrações de 65 a 200 e 1,0 a 3,0 DMM/ml para camundongo (DMNC). Na padronização, da técnica de titulação de toxina em células MDCK observou-se correção de 97% entre a DMMc (Dose Mínima Mortal em camundongo) e ECT (Efeito Citotóxico), quando utilizou-se um fator de correção (FC) e ajustou-se a equação matemática para efeito citotóxico ($ECT=0,32-0,23 \times FC$). A correlação entre o teste de soroneutralização desenvolvido em células MDCK e o teste padrão em camundongos foi de 99,73%.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*, toxina epsilon, soroneutralização

ABSTRACT

The sensitivity of Madin darby kidney bovine cells (MDBK), Madin darby canine cells (MDCK), African green monkey (VERO), Lymphosarcoma de camundongos (L-929), Embryonic tracheal bovine cells (EBTr) and Ovarian hamsters cells (CHO), cell lines β and ϵ -Clostridium perfringens type C and D toxins, respectively, were evaluated, including the development of in vitro quantitating and serum neutralization (SN) assays for ϵ -toxin. The L929 cell line was the most sensitive to β -toxin and MDCK the most sensitive to ϵ -toxin, at concentrations of 65 to 200 and 1.0 to 3.0 MMLD/ml (mouse minimal lethal dose). The standardization of the quantitating assay in MDCK indicated a 97% correlation of MMLD and cytotoxic effect (CTE), using a correction factor (CF): $(CTE=0.32-0.23 \times CF)$. The correlation between the SN in MDCK and the standard mouse assay was of 99,73%.

Keywords: Clostridium perfringens, epsilon toxin, serum neutralization.

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens está entre os microorganismos patogênicos de ampla distribuição mundial e de grande importância na medicina veterinária, é encontrado no solo e trato digestivo dos animais e do homem. Entre as diversas doenças causadas por *Clostridium perfringens*, destacam-se as enterotoxemias que acometem, principalmente, os animais jovens. Com altas taxas de letalidade e seqüelas importantes, como retardo do crescimento. As enterotoxemias acarretam grandes prejuízos aos produtores.

Clostridium perfringens produz toxinas que podem ser identificadas individualmente por soroneutralização. De acordo com a produção de toxinas esse microorganismo é classificado em cinco tipos: A, B, C, D e E. A toxina alfa é produzida pelos cinco tipos de *Clostridium perfringens*, a beta pelos tipos B e C, a épsilon pelos tipos B e D e a iota pelo tipo E.

Clostridium perfringens tipo A é responsável por quadros de mionecroses e enterotoxemia em humanos e animais. O tipo B causa enterotoxemia em cordeiros e está, também, associado às enterites hemorrágicas em bezerros, potros e caprinos (Uzal et al., 2002). O tipo C é o causador da enterite necrótica em humanos e aves e de enterotoxemias em bovinos, cordeiros, leitões e eqüinos (Kennedy et al., 1977a; Kennedy et al., 1977b). O tipo D causa enterotoxemia em ovinos, caprinos e bovinos (Hatheway, 1990; Boorman et al., 2001). O tipo E é responsável por quadros de enterotoxemia em vários animais.

A ocorrência da enterotoxemia está associada a fatores predisponentes, como mudança brusca na alimentação, sobrecarga alimentar, entre outros.

O quadro de enterotoxemia é normalmente agudo ou super agudo, tornando ineficaz qualquer medida terapêutica, mas o controle e a profilaxia podem ser feitos através de

manejo adequado e imunização dos animais.

No Brasil, a produção de vacinas contra as clostridioses tem aumentado a cada ano, com mais de um bilhão de doses produzidas e comercializadas nos últimos 10 anos (Nascimento, 2003). Entretanto, questionamentos têm sido feitos a respeito da eficácia dessas vacinas, pois a maioria não é controlada oficialmente.

A técnica padrão utilizada nos testes de potência de vacinas e no diagnóstico de enterotoxemias, é a soroneutralização em camundongos (SNC). O uso de animais, para esses fins, tem causado inúmeras discussões éticas por grupos que visam o bem-estar animal.

Com o início dos questionamentos bioéticos, iniciou-se uma corrida com o propósito de desenvolver métodos *in vitro* que possam apresentar resultados rápidos e confiáveis, com boa sensibilidade e especificidade, aliados a um baixo custo. O uso de linhagens celulares poderá ser uma opção viável e eficaz à SNC.

Este trabalho teve por objetivos identificar linhagens contínuas de células sensíveis às toxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* tipos C e D, respectivamente; desenvolver um método alternativo para titulação da toxina épsilon; padronizar um teste de soroneutralização (SN) *in vitro* para teste de potência de toxóide épsilon e comparar a sensibilidade dessa técnica com a SNC.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens faz parte de um grupo de microorganismos patogênicos de ampla distribuição mundial. São bastonetes Gram positivos, formadores de esporos, imóveis, anaeróbios, podem ser encontrados em solos, pastagens, água doce ou salgada, alimentos de origem animal ou vegetal e estão, normalmente,

presentes no trato digestivo de espécies domésticas e do homem (MacDonel, 1980).

Welch e Nuttall (1892) descreveram, em materiais de necropsia, a presença de bactéria anaeróbia bastonete Gram positivo, formadora de esporo, denominando-a de *Bacillus aerogenes capsulatus*, posteriormente foi denominado de *Clostridium welchii* e atualmente *Clostridium perfringens*.

Bennets (1932) estabeleceu, na Austrália, o primeiro diagnóstico de enterotoxemia causado pela toxina produzida por *Clostridium perfringens* tipo D, presente no conteúdo intestinal de ovelhas. Rose e Edgar (1936) diagnosticaram em bovinos a enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo A, também na Austrália. Bosworth (1943) identificou a doença em bovinos causada por *Clostridium perfringens* tipo E.

Macrae et al. (1943) descreveram *Clostridium perfringens* tipo A como causa de enterotoxemia em bezerras em fase de aleitamento. Hepple (1952) relatou um caso de enterotoxemia necrótica em bovinos causado do tipo B.

Grinner et al. (1953) e Grinner et al. (1956) relataram quadros de enterotoxemias hemorrágicas causados por *Clostrídios perfringens* tipo C em bezerras, em fase de aleitamento, e por tipo D em bovinos leiteiros.

Clostridium perfringens tipo A é comumente encontrado sob condições não infecciosas e está associado à microflora do solo e trato gastrointestinal, sendo importante causa de intoxicação alimentar (Songer, 1996). Esse tipo de *Clostridium* é mais numeroso no trato intestinal e, sob condições favoráveis de anaerobiose, pH e nutrientes, multiplica e produz exotoxina que causa a gangrena e enterite necrótica em humanos e animais (Hatheway, 1990).

A toxina alfa de *Clostridium perfringens* tipo A produz uma forma incomum da doença chamada de enterotoxemia aguda em

cordeiros, caracterizada clinicamente por anemia, icterícia e hemoglobinúria (Uzal, 2003), causando a morte do animal entre seis a 12 horas após o início dos sintomas (Songer, 1996).

Os tipos B, C, D e E, normalmente, são restritos ao trato intestinal dos animais e, ocasionalmente, do homem. Porém, os tipos B, C e D têm sido isolados do solo, em áreas onde as doenças causadas por esses agentes, acometeram um número significativo de animais (Gibert et al., 1997). *Clostridium perfringens* oriundos do trato intestinal, quando eliminados diretamente no solo, desaparecem dentro de poucos meses (Songer, 1996; Hatheway, 1990).

Estudos mostraram que *Clostridium perfringens* tipo C pode ser causador de ulcerações hemorrágicas ou necrose superficial da mucosa do intestino delgado em humanos, suínos, bovinos e galinhas (MacDonel, 1980; Songer, 1996; Sakurai e Fujii, 1987).

Fatores relacionados a má nutrição, baixa na capacidade de produção de proteases (tripsina), presença de parasitos (*Ascaris*), somados a alimentos que possuem inibidores de tripsina, como a batata doce, têm sido considerados fatores de risco para o desencadeamento da doença (Lawrence e Cooke, 1980). Foram relatados casos esporádicos de necrose intestinal causada por *Clostridium perfringens* tipo C em humanos europeus e americanos (Schwartz et al.; 1980; Severin et al., 1984).

Clostridium perfringens tipos B e D são os responsáveis por quadros de enterotoxemia em ovinos e bovinos (Borrmann et al., 2001). O tipo B é responsável pela disenteria em cordeiros e o tipo D pela doença do rim polposo ou doença da super alimentação em ovelhas e cordeiros, com até 100% de letalidade (Songer, 1996; Sakurai et al., 1997).

Clostridium perfringens tipo E produz duas exotoxinas distintas consideradas como único fator tóxico denominado de iota a (Ia) e iota b (Ib), que são ativadas pelas proteases produzidas pela própria bactéria

ou pela adição de tripsina em culturas jovens (Hatheway, 1990). Após ativação a toxina é dermonecrótica e letal, e pela ação binária (Ia + Ib) observa-se maior atividade tóxica (Stiles e Wilkins, 1986).

2.2. Toxinas

2.2.1. Toxina alfa

Produzida por todos os tipos de *Clostridium perfringens*, principalmente pelo tipo A, com peso molecular de 43Kda, é uma fosfolipase C que hidrolisa a fosfatidilcolina e, em menor proporção, a esfingomiélin, é dependente de íons cálcio (Hatheway, 1990; Songer, 1996).

A ação da toxina alfa, *in vivo*, caracteriza-se por hemólise intravascular, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações do metabolismo, culminando com a morte celular (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Titball et al., 1999). *In vitro*, a toxina alfa é responsável pela reação de lecitinase (precipitação da lecitina) em ágar gema de ovo e hemólise em ágar sangue (Hatheway, 1990).

2.2.2. Toxina beta

A toxina beta, produzida por *Clostridium perfringens* tipos B e C, com peso molecular de 20-42Kda, quando mantida a 50°C por cinco minutos, perde 75% da atividade biológica e acima de 60 minutos a perda da toxicidade é superior a 95%. É estável a -20°C por 90 dias e na presença de enzimas proteolíticas (tripsina ou quimiotripsina) é completamente destruída após 30 minutos a 37°C (Worthington e Mulders, 1975; Sakurai e Duncan, 1977; Sakurai e Duncan, 1978; Sakurai e Fujii, 1987).

Os primeiros estudos sobre a ação da toxina beta demonstraram capacidade dermonecrótica e letal em cobaios e camundongos (Sakurai e Duncan, 1977; Sakurai e Duncan, 1978). O gene que expressa a toxina beta foi clonado e sequenciado por Hunter et al. (1993), que observaram a capacidade dessa toxina de

formar poros na membrana celular, ação semelhante à da toxina alfa, às da gamma hemoglobina e da leucosidina do *Staphylococcus aureus* (Gibert et al., 1997).

Sakurai et al. (1981) mostraram os efeitos da toxina beta em causar depressão cardíaca, respiratória e morte em camundongos inoculados. Sakurai et al. (1984) observaram importantes efeitos biológicos da toxina beta em camundongos, após administrações endovenosa de 2µg da toxina purificada, tais como: constrição de arteríolas, aumento da pressão sangüínea e queda do fluxo sangüíneo. Aplicação intradérmica da toxina beta causou constrição local sem alterações na pressão ou fluxo sangüíneo, sugerindo que essa toxina atue no sistema nervoso autônomo e nervos periféricos de camundongos.

Sakurai e Fujii (1987) observaram efeito dermonecrótico 24 horas após inoculação de 2ng de toxina beta. Obtiveram valores de DL₅₀, em camundongos, de 310ng por administração endovenosa, 4,5µg/ml por administração intraperitoneal e 1,3µg para administração oral.

Shatursky et al. (2000) demonstraram que a toxina beta é uma eficiente formadora de poros, atuando nos canais seletivos de cátions sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), causando despolarização das membranas celulares excitáveis e alterações na permeabilidade vascular do sistema nervoso.

Nagahama et al. (2003) observaram que o efeito citotóxico da toxina beta está em promover alteração da permeabilidade celular com ganho de Ca⁺, Na⁺, Cl⁻ e perda intracelular de K⁺.

Recentemente, foram identificados pela reação em cadeia da polimerase, isolados de *Clostridium perfringens* que possuíam um gene que expressa toxina beta-2, responsável por causar enterites em bovinos, suínos e eqüinos (Bueschel et al., 2003).

2.2.3. Toxina épsilon

A toxina épsilon é secretada na forma de protoxina com peso molecular de 32,7Kda (Hunter et al., 1993) e pela ação de enzimas proteolíticas é convertida na forma ativa com peso molecular de 31,2Kda (MacDonel, 1980).

Estudos com a toxina épsilon, em camundongos, mostraram que ela possui capacidade de se ligar à superfície interna de vasos sanguíneos cerebrais, hepáticos, pulmonares e cardíacos, causando edema e necrose tecidual (Buxton, 1978).

Pouco ainda se conhece sobre a base molecular e mecanismo de ação da toxina épsilon, sabe-se de sua ligação a sítios receptores presentes nos vasos sanguíneos com aumento da permeabilidade vascular e edema (Bormann et al., 2001).

A toxina épsilon é produzida pela bactéria no intestino do animal e absorvida pelos tecidos, agindo em seguida no sistema nervoso (McDonel, 1986). Altas concentrações dessa toxina levam a um aumento da permeabilidade capilar em órgãos e tecidos, incluindo mucosa intestinal, e grandes lesões vasculares (Niilo, 1980; Songer, 1996).

2.2.4. Toxina iota

A toxina iota é produzida por *Clostridium perfringens* tipo E na forma de protoxina, e é ativada proteoliticamente pela tripsina (Hatheway, 1990).

A toxina iota é formada por duas subunidades protéicas imunologicamente distintas: iota a (Ia), um componente enzimático com peso molecular de 47,5Kda e a iota b (Ib), um componente ligante com peso molecular de 71,5Kda. Essas subunidades, em combinação, possuem atividades dermonecroticas e citotóxicas (Hatheway, 1990; Sakurai et al., 2003).

2.3. Diagnóstico de Enterotoxemia

No diagnóstico da enterotoxemia, deve-se levar em consideração os sinais clínicos, as

lesões macro e microscópicas e a presença do agente e de sua toxina (Songer, 1996; Uzal, 2004). O material para o diagnóstico é o conteúdo intestinal, que deve ser enviado ao laboratório congelado ou mantido resfriado. A toxina deve ser conservada a baixas temperaturas (Niilo, 1965), sendo que o rápido congelamento do material a uma temperatura de -20°C , mantém a toxina estável por mais tempo (Uzal et al., 2003; Uzal, 2004).

Ao longo dos anos de estudos das clostridioses foram desenvolvidos vários métodos de diagnóstico laboratorial, na tentativa de se estabelecer testes mais precisos. Foram padronizados os métodos de difusão radial simples (Mancini et al., 1971), fixação do complemento (Marucci e Fuller, 1971), hemaglutinação passiva de fase reversa (Beh, 1978), várias técnicas de ensaio imunoenzimáticos (Weddell e Worthington, 1984; Nagahama et al., 1991; El Idrissi e Ward, 1992a; El Idrissi e Ward, 1992b), aglutinação em látex (Martin e Naylor, 1994), reação em cadeia da polimerase (Havard et al., 1992) e a utilização de linhagens contínuas de células (Payne et al., 1994; Knight et al., 1990).

O teste padrão para o diagnóstico das enterotoxemias é a soroneutralização em camundongos (European Pharmacopoeia, 1998).

Estudos, *in vitro*, usando linhagens celulares e toxina beta são bastante limitados, pois, essa toxina demonstra baixo efeito citotóxico. Jolivet-Reynaud et al. (1986) estudaram a toxina beta nas linhagens celulares Kidney african green monkey (VERO), fibroblasto humano e animal, células intestinais (Hep Cells) e Chinese hamsters ovary cells (CHO), e observaram que apenas na linhagem CHO houve ação citotóxica em concentrações de toxina beta relativamente baixas (entre 0,1–10 μg).

Knight et al. (1986) avaliaram a citotoxicidade de filtrados de *Clostridium perfringens* tipo C em linhagem celular e observaram que na linhagem Embryo

bovine tracheal cells (EBTr) houve efeito citopático.

Steinthorsdottir et al. (1999) demonstraram que, na concentração de 2ng/ml, a beta toxina forma complexos oligoméricos em linhagem Umbilical cord human (HUV-EC-C) e induz liberação do ácido aracdônico e inositol sem causar a morte celular.

Nagahama et al. (2003) observaram que entre as linhagens celulares african green monkey (VERO), ovary hamster cells (CHO-K1), african green monkey (SV40) transformed (COS-7), embryonic intestine human (INT 407), carcinoma epithelioid human (HeLa), MDCK, adrenal pheochromocytoma rat (PC12), mastocitoma de rato (P810) e promyelocytic leukemia human (HL60), apenas a HL60 foi sensível à toxina beta na concentração de 5µg/ml. A destruição celular ocorreu após seis horas de incubação a 37°C. Nas demais linhagens, mesmo com concentrações equivalentes a 50µg/ml, nenhum efeito citotóxico foi observado.

A toxina épsilon tem sido avaliada em linhagens celulares e tem apresentado resultados mais promissores que a beta toxina.

Knight et al. (1990) observaram efeitos citotóxicos da toxina épsilon em linhagem contínua de células MDCK. Payne et al. (1994) relataram que a toxina épsilon na concentração de 15ng/ml, causou efeito citotóxico em células MDCK, à microscopia, foram observadas rupturas na membrana com 50% de morte celular 11 minutos após exposição à toxina.

Petit et al. (1997) demonstraram que em células MDCK, 13ng/ml de toxina épsilon causaram 80% de perda intracelular de K⁺ com 65% de morte celular 60 minutos após exposição.

Shortt et al. (2000) pesquisaram os efeitos citotóxicos da toxina épsilon em linhagens celulares humanas e animais e observaram que as linhagens MDCK e renal leiomyoblastoma human (G-402) foram as

mais sensíveis à toxina épsilon nas concentrações de 2µg/ml e 280µg/ml, respectivamente, causando 50% de destruição celular.

2.4. Teste de potência de toxóide

A avaliação da potência do toxóide épsilon é feita por imunização de coelhos e as titulações de anticorpos pelo teste de SNC (Glenny et al., 1931; European Pharmacopoeia, 1998) e pelo teste intradérmico em cobaias (Glenny et al., 1933). A utilização do teste intradérmico possibilitou substancial redução no número de animais (Knight et al., 1990)

Por razões bioéticas, diversos métodos *in vitro* foram desenvolvidos, destacando-se os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que apresentam alta sensibilidade e especificidade quando comparado à SNC (Naylor et al., 1987; Nagahama et al., 1991; Wood, 1991; El Idrissi e Ward, 1992a; El Idrissi e Ward, 1992b).

Outro método alternativo à SN em camundongos para avaliar potência de toxóides clostridiais, é o uso de linhagens celulares. Knight et al. (1990) e Roth et al. (1999) observaram que a SN *in vitro*, com linhagem celular, poderia ser usada em substituição à SNC.

Knight et al. (1990) desenvolveram um método *in vitro* para avaliação de toxóide épsilon e demonstraram que o uso da linhagem celular MDCK apresentou bons resultados em relação à sensibilidade e boa correlação com os testes padronizados *in vivo*. No método *in vitro* padronizado para o toxóide alfa, os autores observaram que a linhagem celular é um modelo indicador mais sensível, pois detecta títulos mais baixos de anticorpos quando comparado à SNC e ao teste dermonecrótico.

Roth et al. (1999) usaram a linhagem celular VERO para avaliar vacinas comerciais contendo toxóide alfa de *Clostridium septicum* e observaram que tanto a toxina padrão como a produzida em laboratório

foram neutralizadas pelas antitoxinas presentes no soros dos animais imunizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no laboratório de anaeróbios e no laboratório de cultivo celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17-22g, de ambos os sexos, cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura-Pecuária e do Abastecimento (MAPA) em Minas Gerais e pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

3.3. Toxina e anti-toxina padrão

A toxina épsilon foi adquirida do Agriculture Animal Plant Health Inspection Service (APHIS-EUA/IRP407), a anti-toxina épsilon padrão, contendo 1020UI/ampola, do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) da Inglaterra.

3.4. Culturas de células

3.4.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares: Madin darby kidney bovine cells – ATCC/CCL-22 (MDBK), Madin darby canine cells – ATCC/CCL-34 (MDCK), African green monkey – ATCC/CCL-81 (VERO), linfossarcoma de camundongos – NCTC Clone 929 – ATCC/CCL-1.1 (L-929), Embryonic tracheal bovine cells – EBTr (ATCC/CCL-44) e Ovarion hamsters cells – ATCC/CCL61 (CHO).

As linhagens MDCK, MDBK, L-929, VERO e EBTr foram cultivadas no meio essencial

mínimo de Eagle¹ (EMEM) suplementado com soro fetal bovino² (SFB) 10% (v/v), penicilina 200UI/ml, estreptomicina 200µg/ml, anfotericina B 0,25mg/ml e glutamina 2mM/ml. Para a linhagem CHO utilizou-se o meio F-10¹, suplementado como descrito acima. Foram usadas solução salina tampão fosfato (PBS) – pH 7,2 (NaCl 8,0g, KCl 0,20g, Na₂HPO₄H₂O 1,13g, KHPO₄ 0,20g, H₂O Milli-Q qsp 1000ml) e solução de tripsina/versene² (ATV), de acordo com Andrade (2000). Para lavagem utilizou-se uma solução contendo 0,5% de formol PA, 1% de CaCl₂, em H₂O Milli-Q e para absorbância usou-se solução contendo etanol a 50% e ácido acético glacial a 1%, em H₂O Milli-Q.

As linhagens de células foram cultivadas em frascos de 150cm³ até a confluência mínima de 90%, em estufa úmida com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C. As células foram contadas após os procedimentos de lavagem da monocamada com PBS e descolamento da mesma com ATV. Os ensaios foram padronizados em placas³ de 96 poços de fundo plano, para cultivo celular, utilizando-se 4,8 x 10⁴ células/100µl/poço (Mahony et al., 1989).

3.5. Produção das Toxinas

3.5.1. Amostras de *Clostridium perfringens* tipos C e D

Para a produção de toxinas foram utilizadas amostras de *Clostridium perfringens* tipos C e D, fornecidas pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA – Bariloche, Argentina.

As amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,0ml de caldo tioglicolato² e transferidas para dois tubos de rosca (16x160mm) contendo 10ml de tioglicolato. Os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas em jarra de anaerobiose (10% de CO₂, 10% de H₂, 80% de N₂). Em seguida, as culturas foram semeadas em ágar sangue de equino a 7% e em ágar sulfato

¹ Gibco, EUA

² Difco, EUA

³ Sarstedt, EUA

de polimixina sulfatiazina (SPS)² e incubadas em anaerobiose a 37°C por 24 horas. Após o crescimento em meio sólido, colônias características de *Clostridium perfringens* foram coradas pelo método Gram para verificação da pureza. As colônias consideradas puras foram semeadas em tubos de rosca, contendo 50ml de caldo tioglicolato e incubadas em anaerobiose, por 24 horas, a 37°C.

3.5.2. Produção de toxina beta e épsilon

A produção das toxinas beta e épsilon foram feitas por inoculação das culturas no meio de produção de toxina (MTP) (Azevedo et al., 1998), na proporção de 10% (v/v) e incubação, por oito horas, em anaerobiose, a 37°C.

Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 16000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi concentrado a 1/10 do volume inicial, por filtração em sistema Amicon⁴ a 4°C, usando-se membrana de retenção de 10Kda. Os sobrenadantes concentrados foram fracionados em tubos de eppendorf e mantidos a -80°C até o momento do uso.

3.5.3. Detecção e tipificação das toxinas produzidas

Duas alíquotas do sobrenadante concentrado de *Clostridium perfringens* tipo C (toxina beta) foram separadas, sendo uma acrescida com 10µl/ml de tripsina a 1%, e ambas foram mantidas em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 0,2ml de cada alíquota foram inoculados via endovenosa em dois camundongos, os animais foram observados por 72 horas (Sakurai e Duncan, 1978). Da mesma forma, duas alíquotas do sobrenadante concentrado de *Clostridium perfringens* tipo D (protoxina épsilon) foram separadas, sendo uma ativada com tripsina 1%, mantidas em estufa e inoculadas em camundongos (Sebald e Petit, 1997).

As toxinas foram tipificadas pelo método de SNC de acordo com metodologia preconizada por Sterne e Batty (1975).

3.5.4. Titulação das toxinas *in vivo*

Para determinar a dose mínima mortal (DMM), as toxinas beta e épsilon foram tituladas utilizando-se diluições na base dois, em água peptonada a 1%. Para cada diluição foram inoculados, com 0,2ml por via endovenosa, dois camundongos que foram observados por 72 horas (European Pharmacopoeia, 1998).

3.5.5. Teste de sensibilidade das toxinas beta e épsilon

As linhagens celulares foram semeadas 24 horas antes, em placas de 96 poços, na concentração de $4,8 \times 10^4$ /100µl/poço. Após a retirada do sobrenadante, foram acrescentadas as toxinas beta e épsilon diluídas em EMEM com SFB a 1%. Triplicatas de cada diluição, entre 4200 até 0,5DMM/ml, de cada toxina foram adicionadas nas placas no volume de 100µl/poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Retirou-se o sobrenadante, com cuidado para não descolar a monocamada, e adicionou-se 100µl/poço da solução de vermelho neutro [151µl da solução mãe de vermelho neutro (VN) para 10ml de EMEM com SFB a 1%]. A placa foi incubada por mais três horas em estufa de CO₂ a 37°C, em seguida adicionou-se a solução de lavagem na quantidade de 100µl/poço, repetindo esse passo duas vezes consecutivas. Após lavagem, foram adicionados em cada poço 100µl da solução de absorvância e as placas foram mantidas sob agitação constante (100RPM), por 30 minutos. A leitura foi feita, em seguida, utilizando-se um leitor de ELISA calibrado na absorvância de 540nm, para observação do efeito citotóxico (ECT) das toxinas beta e épsilon nas linhagens celulares (White e Seaman, 1995).

⁴ Millipore Corporation, EUA

3.6. Elaboração da equação da curva e fórmula matemática

A partir dos resultados obtidos e seleção da linhagem mais sensível à toxina épsilon, foram feitos dois ensaios, como descrito no item 3.5.5, empregando-se diluições 1:1,2 em 12 repetições, no intervalo de 3 a 1 DMM/ml. Os resultados obtidos nos dois ensaios foram agrupados e utilizando-se o programa de sistema de análise estatística (SAS), e por meio de um procedimento REG, desenvolveu-se a equação matemática (Sampaio, 1998). Com um modelo linear matemático elaborou-se a equação que melhor adaptou-se aos intervalos encontrados em DMM/ml, apresentando um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,97$.

3.7. Titulação da toxina épsilon em células MDCK

Várias partidas de toxina épsilon foram produzidas como descrito no item 3.5.2 e tituladas simultaneamente em camundongos e em células, de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.5.4 e 3.5.5, empregando-se diluições na base dois, em triplicatas. O título de cada partida, expresso em ECT, foi determinado pela equação matemática e na correlação entre os testes *in vivo* e *in vitro*, utilizou-se a análise estatística de Spearman (Sampaio, 1998).

3.8. Teste de potência

3.8.1. Linhagem celular e meios soluções e reagentes

Para padronização do teste de potência do toxóide épsilon empregou-se a linhagem celular MDCK, solução de EMEM com 5% de SFB. Para coloração celular, utilizou-se uma solução contendo 1g de cristal violeta, 500ml de Etanol PA e H₂O (Milli-Q) qsp 1000ml (Griffiths et al., 1994).

3.8.2. Soros testes

Foram empregados sete *pools* de soros de coelhos imunizados com vacinas clostridiais,

um *pool* de soros de coelhos imunizados com toxóide padrão épsilon (T₁₅), e um *pool* de soros de coelhos inoculados com solução salina 1% (T₀₁), cedidos pelo laboratório de anaeróbios. O soro anti-épsilon padrão, adquirido junto ao NIBSC, foi diluído para conter 4, 10, 90 e 180UI/ml. Todos os soros testes foram identificados por tratamentos (T₀₁, T₀₃, T₀₅, T₀₆, T₀₇, T₁₀, T₁₁, T₁₅, T₁₇, T_(Soro Padrão) 4UI/ml, T_(Soro Padrão) 10UI/ml, T_(Soro Padrão) 90UI/ml e T_(Soro Padrão) 180UI/ml).

Os anticorpos neutralizantes dos soros testes foram previamente titulados no LANAGRO/MG, pelo teste de SNC, a um nível de teste L+/10 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,1UI de anti-toxina padrão homóloga causa morte de 100% dos camundongos inoculados) (European Pharmacopoeia, 1998).

3.8.3. Padronização da toxina épsilon

A toxina épsilon foi padronizada em linhagem MDCK empregando-se nível de teste de L+/50 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,02UI de anti-toxina padrão homóloga causará 70% de ECT). Diluições seriadas da toxina na base dois foram distribuídas em placas de 96 poços, 50µl por poço. Para cada diluição foram utilizadas oito repetições. Adicionou-se em cada poço 50µl de anti-toxina épsilon padrão homóloga, contendo 0,02UI. As placas foram homogeneizadas manualmente, por 30 segundos, e incubadas a 37°C por uma hora, em estufa úmida com 5% de CO₂. Após esse período, a cada poço adicionou-se 50µl de uma suspensão contendo 4×10^4 células, as placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores, por mais 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e a cada poço, foram adicionados 100µl de solução de cristal violeta a 0,1% (Griffiths et al., 1994). Consideram-se os títulos ECT_{50%} (Reed e Muench, 1938) e ECT_{100%}. Para a leitura visual dos poços considerou-se como efeito não citotóxico a destruição celular abaixo de 30%.

Para a titulação dos soros em células, a toxina APHIS (TA) e a toxina produzida durante o experimento (TP) foram padronizadas em nível de teste L+/50, utilizando-se soro padrão homólogo.

3.8.4. Teste de potência *in vitro*

Para a titulação de cada soro teste, em placas de cultivo celular, foram feitas diluições de 1:2,5 até 1:320, em quadruplicata, com um volume de 50µl por poço. A seguir, em cada poço foram adicionados 50µl da toxina padronizada. Para o controle negativo (100% de células viáveis) foram utilizados 50µl de EMEM em substituição aos 50µl da toxina padronizada e para o controle positivo (100% morte), utilizou-se 50µl da toxina em substituição ao soro teste. Da mesma forma, para o controle dos soros, foram distribuídos em placas de 96 poços 50µl dos soros testes nas diluições de 1:2,5 até 1:20, substituindo-se os 50µl da toxina padronizada por 50µl de EMEM com 5% SFB. Em seguida, as placas foram homogeneizadas manualmente, por 30 segundos, e incubadas por 60 minutos a 37°C, em estufa úmida com 5% de CO₂. Após esse período, adicionou-se a cada poço, uma suspensão contendo 4 x 10⁴ células, as placas foram homogeneizadas e incubadas, como descrito anteriormente, por mais 48 horas. As placas foram coradas e os títulos dos soros determinados como descrito no item 3.8.3. Para averiguar a repetibilidade do teste e sua concordância com a SNC, foram feitas três repetições e em quadruplicata, nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.8.4.1. Análise Estatística

Para análise dos resultados empregou-se uma correlação paramétrica, através da análise estatística usando-se o quadrado de Pearson (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de *Clostridium perfringens* avaliadas pelo método de Gram, apresentaram-se puras, observando-se somente bastonetes Gram positivos. No

crescimento em ágar SPS, as colônias mostraram-se enegrecidas indicando a reação sulfito/redutor, característica dessa espécie.

No teste de detecção de toxina, o sobrenadante concentrado de cultura de *Clostridium perfringens* tipo C tratado com tripsina não causou efeito letal aos camundongos, ao contrário do sobrenadante não tratado, que foi letal. O sobrenadante concentrado da cultura de *Clostridium perfringens* tipo D tratado com tripsina foi letal para os animais, enquanto os animais inoculados com o sobrenadante não tratado permaneceram vivos.

As inoculações em camundongos de sobrenadante de culturas e conteúdo intestinal de animais com suspeita de enterotoxemia, tratados e não tratados com tripsina, são consideradas boas ferramentas para detecção de toxinas beta e épsilon. Porém, para a tipificação dessas toxinas, o método padrão continua sendo a SNC (Sterne e Batty, 1975)

Os animais inoculados com as misturas de sobrenadante concentrado de cultura de *C. perfringens* tipo C e anti-toxina beta, e sobrenadante concentrado de cultura de *Clostridium perfringens* tipo D e anti-toxina épsilon, permaneceram vivos, confirmando serem as toxinas beta e épsilon de *C. perfringens* tipo C e D, respectivamente.

No bioensaio em camundongos, o título das primeiras partidas de toxinas beta e épsilon, concentradas 10 vezes, foi de 4200DMM/ml. Na segunda partida de toxina épsilon, concentrada 10 vezes, o título foi de 25600DMM/ml.

Os diferentes títulos observados entre as partidas de toxinas produzidas foram provavelmente, devido ao cultivo de *Clostridium perfringens* em sistema estático sem controle automático de pH durante incubação, havendo apenas a calibração do pH do MPT para 7,4, antes da inoculação, temperatura de 37°C e tempo máximo de incubação de nove horas, em jarra de anaerobiose.

As avaliações periódicas das partidas de toxinas, pelo método do bioensaio em camundongos, demonstraram que a toxina beta mantida a -80°C conservou sua atividade durante os 17 meses de duração deste estudo. Este tempo foi superior ao demonstrado por Sakurai e Duncan (1978) que descreveram que a toxina beta mantida -20°C conservou sua atividade por 90 dias.

Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que temperaturas mais baixas de estocagem favoreceram a estabilidade das toxinas, o que também foi observado por Uzal et al. (2003) e Uzal (2004).

A toxina épsilon mantida nas mesmas condições da toxina beta, apresentou menor estabilidade com redução de 23,8% da atividade tóxica e redução do título para 3200DMM/ml, após oito meses de estocagem a -80°C . Os resultados sugerem que apesar de ter mantido sua atividade tóxica compatível com as provas realizadas durante todo o período do experimento e inalterada do oitavo até o 17° mês, a toxina épsilon é menos estável que a toxina beta.

Os resultados do teste de sensibilidade das seis linhagens celulares estudadas frente às toxinas beta e épsilon encontram-se na Tab. 1.

Tabela 1. Teste de sensibilidade de linhagens celulares às toxinas beta e épsilon, em DMM/ml.

Linhagens Celulares	Limite de Sensibilidade (ECT) ¹ (DMM/ml) ²	
	Beta	Épsilon
VERO	800-60	350-60
MDCK	400-100	3,0-1,0
L929	200-65	600-79
MDBK	800-14	830-260
CHO*	Nenhum ECT observado*	-**
EBTR*	Nenhum ECT observado*	-**

* foram testadas concentrações de 0,5 a 1000 DMM/ml;

** ensaio não efetuado;

¹ efeito citotóxico

² dose mínima mortal/ml calculada em camundongos

Em relação à toxina verificou-se que a linhagem celular mais sensível foi a L929, o ECT foi observado nas concentrações de 65 a 200DMM/ml da toxina. Nas linhagens celulares CHO e EBTr, concentrações de 0,5 a 1000DMM/ml não causaram efeito na monocamada celular. Os resultados encontrados em relação às linhagens EBTr e CHO divergem dos encontrados por Knight et al. (1986) e Jovilet-Reynaud et al. (1986), que observaram ECT nessas linhagens. O segundo melhor resultado observado foi com a MDCK, mas os intervalos encontrados em DMM foram bastante amplos e os níveis de sensibilidade observados foram baixos. Nas

demais linhagens os níveis de sensibilidade foram semelhantes, com um intervalo de 14 a 800DMM/ml. Uma possível explicação para esses resultados, em relação aos níveis de sensibilidade *in vivo*, poderiam ser os achados de Knight et al. (1990) que ao avaliarem a neutralização da ação da toxina beta em linhagem celular MDCK, empregando anticorpos policlonais e monoclonais, verificaram que os anticorpos monoclonais não neutralizaram a atividade citotóxica da toxina beta. Esses autores concluíram que a atividade biológica que causa morte dos camundongos e ação dermonecrótica em cobaias é distinta daquela que causa efeito citotóxico em

linhagem celular. Os resultados observados sugerem a realização de novos estudos com outras linhagens celulares.

A linhagem celular mais sensível à toxina épsilon foi a MDCK, em DMM/ml, foi 60 vezes superior à linhagem VERO que foi a segunda em sensibilidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Payne et al. (1994) que ao avaliarem 12 linhagens celulares, observaram que somente a MDCK foi sensível à toxina épsilon, e Shortt et al. (2000) ao avaliarem 17 linhagens humanas e a linhagem MDCK, confirmaram a maior sensibilidade da MDCK à toxina épsilon.

A melhor explicação para justificar a maior sensibilidade da linhagem MDCK à toxina épsilon, é a sua origem de células epiteliais renais, que apresentam também uma maior sensibilidade *in vivo*. O ECT está relacionado à presença de receptores específicos presentes na linhagem MDCK (Petit et al., 1997; Boormann et al., 2001) que é entre as linhagens celulares, até hoje testadas, a mais indicada para pesquisa da toxina épsilon.

A toxina épsilon possui diversas propriedades biológicas que são usadas para demonstrar sua presença, entre elas, capacidade dermonecrotica, letalidade para camundongos (Batty e Glenny, 1947; Grinner et al., 1956), alterações em órgãos vitais (Nagahama e Sakurai, 1991) e ECT para a linhagem MDCK (Payne et al., 1994).

O uso de linhagens celulares para estudar os efeitos *in vitro* e o conhecimento do mecanismo de ação da toxina são importantes passos no desenvolvimento de métodos alternativos, que possibilitem a diminuição dos custos para o diagnóstico laboratorial dessa clostridiose.

Na padronização da titulação da toxina épsilon em células MDCK, os valores observados nas doze repetições (Tab. 2) foram expressos em um fator de correção (FC), que correspondeu ao valor da D.O. observado para cada concentração de toxina, dividido pelo valor da D.O. do controle negativo (monocamadas que não receberam toxinas). Optou-se pela utilização do FC para minimizar as variações nas concentrações de células/poços que podem ocorrer de ensaio para ensaio. Como esse é um método muito sensível, essas variações podem ser significativas. Como exemplo, observou-se que as médias dos valores dos controles negativos em três ensaios, em diferentes dias, foram em D.O.: 1,0; 0,9; 0,98; 0,89. A solução de VN cora os lisossomas de células viáveis e quanto maior o número de células vivas maior foi a fixação do corante, conseqüentemente maior a densidade óptica (D.O.).

A partir dos dados da, Tab. 2 foi construído o gráfico (Fig. 1) e estabelecida a melhor equação que representou o fenômeno biológico observado.

Tabela 2. Titulação de toxina épsilon em células MDCK – valores de D.O. obtidos em 12 repetições de cada concentração

DMM/ml	3,00	2,50	2,08	1,736	1,446	1,205	1,004	C-	C+
	0,104	0,120	0,283	0,536	0,550	0,734	0,862	1,003	0,005
	0,087	0,142	0,268	0,523	0,862	0,708	0,962	1,037	0,003
	0,101	0,156	0,258	0,590	0,650	0,747	0,912	1,031	0,002
	0,128	0,261	0,424	0,527	0,632	0,802	0,939	1,055	0,006
	0,102	0,173	0,378	0,626	0,700	0,780	0,960	1,003	0,003
	0,103	0,249	0,434	0,646	0,693	0,767	0,972	1,076	0,004
	0,122	0,140	0,354	0,530	0,717	0,866	0,976	1,086	0,002
	0,112	0,183	0,441	0,568	0,710	0,865	0,986	1,022	0,004
	0,102	0,214	0,598	0,645	0,788	0,891	0,983	1,088	0,003
	0,204	0,278	0,644	0,504	0,770	0,888	1,028	1,072	0,004
	0,107	0,142	0,577	0,538	0,759	0,874	0,983	1,063	0,001
	0,089	0,109	0,638	0,496	0,745	0,885	0,985	1,054	0,004
MD	0,113	0,180	0,441	0,560	0,716	0,817	0,962	1,0492	0,0034
DP	0,030	0,057	0,142	0,053	0,050	0,068	0,042	0,0299	0,0014
FC	0,108	0,172	0,420	0,534	0,682	0,7790	0,917	1,000	0,0033

DMM/ml = dose mínima mortal calculada em camundongo

MD = média dos valores das D.O.;

DP = desvio padrão;

FC = D.O. da média/1,0492 (médias de C-).

C+ = controle positivo

C- = controle negativo

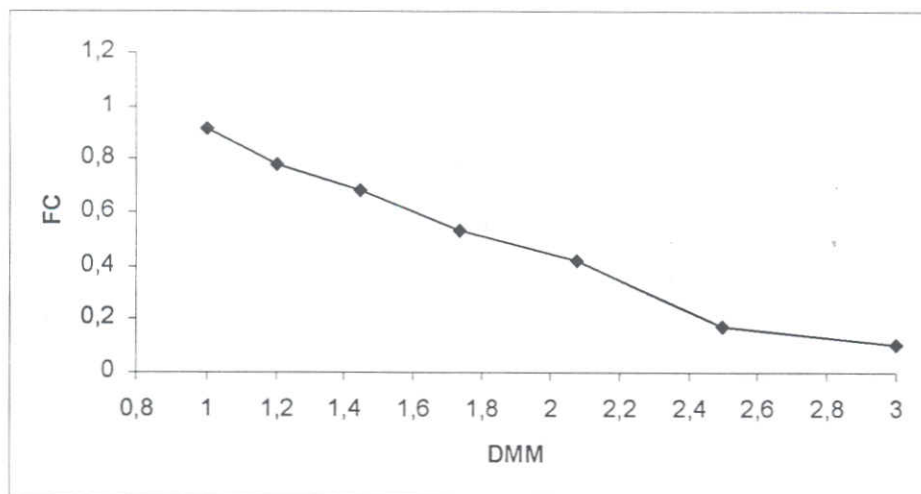


Figura 1. Representação das médias dos valores, em DMM, observados nas 12 repetições de cada concentração de toxina épsilon em relação ao FC

O modelo linear foi a equação que melhor demonstrou o fenômeno biológico observado sendo representado pela equação matemática: $ECT=0,31-0,23 \times FC$. A equação é válida para FC entre 0,1 e 0,9.

para esses valores o modelo matemático pode ser adotado, apresentando $R^2 = 0,97$. Quando valores hipotéticos de DMM foram aplicados à curva, uma alta correlação foi observada (Tab. 3).

Tabela 3. Estimativa do efeito citopático *in vitro* baseada nos ensaios *in vivo* expressos em DMM, para pesquisa da toxina épsilon

DMM/0,1ml	Estimativa	FC (D.O.)
0,3	0,285137	0,1081
0,25	0,270417	0,1721
0,208	0,213239	0,4207
0,1736	0,191711	0,5143
0,1446	0,152933	0,6829
0,1205	0,130807	0,7791
0,1004	0,099021	0,9173

$ECT = 0,31 - 0,23 \times FC = a \times b \times 10 = DMM/ml, R^2: 0,97$

DMM= dose mínima mortal calculada pelos limites estipulados *in vitro*;

Estimativa= DMM estudada pela fórmula matemática

FC= D.O. das estimativas/D.O. controle negativo (100% células viáveis)

a= valor extraído da equação matemática

b= diluição da toxina que expressou D.O. nos intervalos considerados para a diluição

Entre as diluições dos sobrenadantes das culturas de *C. perfringens* tipo D, utilizadas para titulação de toxina épsilon, foram selecionados os fatores de correção que apresentaram-se entre 0,1 e 0,9. Esses valores foram aplicados na equação matemática estabelecida e o valor encontrado (expresso em ECT 100%/ml) foi multiplicado pela respectiva diluição. Para se encontrar o título em ECT 100%/ml o valor obtido foi multiplicado por 10.

A Tab. 4 mostra um exemplo de titulação de toxina épsilon de sobrenadante de culturas de *Clostridium perfringens* tipo D, com título de 100DMM/ml em camundongos. Para cálculo do título em ECT 100%/ml, os valores selecionados de FC foram somados e divididos pelo número de pontos selecionados obtendo-se assim a média *in vitro*.

Tabela 4. Titulação de toxina épsilon em MDCK

DIL.	100	200	400	800 ¹	1000 ¹	2000	4000	C-	C+
D.O.	0,071	0,072	0,073	0,196	0,21	1,14	1,158	1,049	0,02
D.O.	0,064	0,067	0,073	0,214	0,217	1,107	1,093	0,991	0,06
D.O.	0,062	0,068	0,079	0,184	0,215	0,888	1,241	1,031	0,04
Média	0,066	0,069	0,075	0,198	0,214	1,045	1,164	1,024	0,04
DP	0,005	0,003	0,003	0,015	0,004	0,137	0,074	0,030	0,02
FC	0,064	0,067	0,073	0,193	0,209	1,021	1,137	1,000	0,019
ECT=0,31-0,23FC	0,295	0,294	0,293	0,265	0,2619	0,0751	0,0484	-	-
Valores (ECT/ml)	295,2	588,9	1172,5	2124,0	2619,1	1503,8	1938,1	-	-

¹ leituras no intervalo definido pela equação, entre 0,1 e 0,9.

Dil= diluição da toxina épsilon; D.O.= densidade optica; DP= desvio padrão; ECT= efeito citopático; FC= fator de correção

C+: células mais toxinas; C-: células mais meio MEM

Os resultados obtidos nas titulações de diferentes sobrenadantes deculturas de *Clostridium perfringens* tipo Cestão na Tab. 5.

Tabela 5. Títulos de toxina épsilon em dose mínima mortal (DMM/ml) e efeito citopático (ECT/ml)

Titulação <i>in vivo</i> ¹ (DMM/ml)	Títulos máximo e mínimo obtidos <i>in vitro</i> ² (ECT/ml)	Média <i>in vitro</i> ³ (ECT/ml)	Média <i>in vivo</i> /média <i>in vitro</i>
25600	18937-54751	38318	0,66
4200	4087	4087	1,02
3072	2878-4432	3655	0,84
2300	2249-1404	1859	1,23
2100	2124-2619,1	2371,55	0,88
1535	1152-2394	1854	0,82
850	823-1063	1024	0,83
768	573-1134	893	0,86
100	54-66	60	0,6

¹ valores determinados por bioensaio em camundongos.

² valores de ECT 100%/ml para a célula MDCK obtido pela equação (ECT=0,31-0,23 FC).

³ média dos valores dos FC entre 0,1 e 0,9.

Pode-se observar que os títulos obtidos *in vitro* variaram em relação aos títulos expressos em DMM/ml, determinados em camundongos. Comparando-se a média dos valores obtidos na titulação em células, expressos em ECT/ml, e os títulos estabelecidos *in vivo*, observa-se uma correlação de 98,33% entre os testes, calculado pelo método de Spearman. Nota-se que apesar dos títulos não serem exatamente iguais há uma correspondência entre DMM/ml e ECT/ml. O teste em cultura de células acompanhou a tendência dos títulos *in vivo* mostrando que os fenômenos biológicos observados *in vivo* e *in vitro* são os mesmos.

O teste padronizado neste trabalho pode ser utilizado para a titulação de sobrenadantes de culturas e toxinas concentradas. Essa técnica poderá ser usada na triagem de sobrenadantes de culturas de *C. perfringens* tipo D, utilizados na produção de toxóides, em substituição ao bioensaio em camundongos. Além disso responde aos anseios bioéticos dispensando, ou pelo menos, diminuindo o número de camundongos empregados para esse fim.

Os resultados obtidos permitem inferir que a metodologia, desenvolvida neste trabalho, poderá ser empregada no diagnóstico de enterotoxemia causada por *C. perfringens* tipo D, em substituição à soroneutralização.

Neste trabalho foi, também, padronizado o teste de soroneutralização para titulação de anticorpos anti-toxina épsilon em células MDCK. A partir de uma toxina padronizada no nível de teste L+/50 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,02UI de anti-toxina padrão homóloga causará pelo menos 70% de ECT), foram testados soros com títulos, previamente conhecidos, obtidos em provas de soroneutralização em camundongos.

Para se determinar o ponto de corte foram observadas diversas variáveis, durante os procedimentos de padronização do teste, entre as quais citam-se o tempo de leitura de 24 ou 48 horas, concentrações de 2,5 a 4×10^4 células por poço, observação do ECT por microscopia ou coloração pelo cristal violeta e percentagem de destruição da monocamada. Nos inúmeros ensaios realizados constatou-se que o melhor tempo de leitura do teste foi de 48 horas após incubação e a melhor concentração de

células por poço foi de 4×10^4 . Quanto ao ponto de corte, considerou-se a maior diluição do soro onde observou-se 70% de ECT na monocamada, determinado visualmente após coloração com solução de cristal violeta a 1%. O uso da solução de cristal violeta a 1% permitiu uma leitura visual rápida sem necessidade do uso de microscópio e também possibilitou o armazenamento das placas por tempo indeterminado.

Na leitura, os poços dos soros testados que apresentaram destruição na monocamada de células inferior a 70% foram considerados negativos e valores iguais ou superiores a 70% foram considerados positivos. Os títulos dos soros testados foram calculados pelo método de Reed e Muench (1938) e de forma direta, pela maior diluição do soro teste, onde houve 100% de destruição da monocamada de células.

Os critérios adotados na padronização do teste diferem dos empregados por Knight et al. (1990) que utilizaram uma concentração celular de $2,5 \times 10^4$ células/50 μ l, com tempo de leitura variando entre 24 horas até seis dias e, consideraram como ponto de corte, 90% de ECT na monocamada observados por microscopia.

Nove *pools* de soros de coelhos vacinados e soros hiperimunes, previamente titulados *in vivo*, foram submetidos ao teste de potência *in vitro* e apresentaram títulos anti-toxina épsilon, com valores variando de 0 a 180,8UI/ml (Tab. 6).

A repetibilidade dos ensaios *in vitro* foi importante para estabelecer a padronização do teste. Nas triplicatas de cada *pool* de soros testados em diferentes datas, observaram-se praticamente os mesmos resultados para os anticorpos neutralizantes, no ensaio *in vitro*, quando comparados ao método padrão de SN em camundongos.

Foram observados que nos nove *pools* de soros testados *in vitro*, sete não apresentaram títulos e dois apresentaram títulos entre 7,0 e 11,3 UI/ml. Nos quatro testes realizados com soro padrão (SP) os títulos foram de 2,8, 10,28, 90,4, 180,8UI/ml respectivamente. Nos soros testes T₁₀, T₁₇, T₀₁, T₀₃, T₀₅, T₀₆ e T₀₇ não foram detectados anticorpos em nenhum dos testes empregados (Tab. 6).

Ao comparar os resultados dos testes SN *in vitro* para ECT_{50%} aos dos testes de SN *in vivo* pela correlação de Pearson, observou-se concordância de 99,73% entre esses testes. A correlação observada no teste de SN *in vitro* avaliando ECT_{50%} e ECT_{100%} foi de 99,53%. A repetibilidade da SN *in vitro* para ECT_{50%} teve um nível de significância de 99,97% e de 99,91 ECT_{100%}. O dados apresentados demonstraram que a titulação baseada na observação do efeito citotóxico de filtrados de *C. perfringens* tipo D mede a mesma entidade da SN em camundongos (Knight et al., 1990).

Um método desenvolvido por Knight et al. (1990) para a avaliação da potência de toxóide épsilon em linhagem celular MDCK, apresentou bons resultados em relação à sensibilidade e uma correlação de 91% com o teste de SNC. Esse autores demonstraram que, o teste utilizando linhagem celular foi mais sensível do que os métodos *in vivo* (teste dermonecrótico em cobaias e SNC). Com o nível de teste L+/50 o método de SN em linhagens de células MDCK detectou menor quantidade de anti-toxina épsilon quando comparado com a SNC, permitindo a detecção de 0,4UI/ml, 2,5 vezes superior ao teste *in vivo*, empregando-se o nível de teste recomendado pela European Pharmacopoeia (1998).

Tabela 6. Título em UI/ml de anti-toxina épsilon em *pool* de soros de coelhos e soro padrão, pela técnica de SN em camundongos em linhagem de células MDCK

Soros	SN <i>in vivo</i>	M SN <i>in vivo</i>	ECT _{50%}	M ECT _{50%}	DP DL _{50%}	ECT _{100%}	M ECT _{100%}	DP ECT _{100%}
T01	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T03	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T05	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T06	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T07	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T10	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T17	0	0	0 0 0	0	0	0 0 0	0	0
T15	8 e 16	12	11,3 11,3 11,3	11,3	0	22,6 22,6 22,6	22,6	0
T11	4 e 8	6	5,6 5,6 9,8	7	2,4	11,27 11,27 26,5	16,3	8,79
SP4UI/ml	2 e 4	3	2,8 2,8 2,8	2,8	0	5,6 5,6 5,6	5,6	0
SP10UI/ml	8 e 16	12	10,29 9,3 11,27	10,28	0,98	24,6 27,09 27,09	26,2	1,43
SP90UI/ml	90-110	100	90,4 90,4 180,8	90,4	0	180 180 360	180	0
SP180UI/ml	180-200	190	180,8 180,8 180,8	180,8	0	360 360 360	360	0

SN= soroneutralização; ECT= efeito citopático; M= média; DP= desvio padrão; SP= soro padrão; T= tratamento

Este estudo mostrou a possibilidade de se detectar anti-toxina épsilon de forma precisa, sensível, prática, rápida e sem o uso de camundongos. O método de SN *in vitro* em linhagem de célula MDCK, padronizado neste experimento, demonstrou ser uma opção viável para substituir o método *in vivo* no teste de potência de vacinas clostridiais que contenham em sua composição toxóide épsilon. Os resultados demonstraram alta correlação entre testes *in vitro* e *in vivo* os valores do ECT_{50%} e ECT_{100%} foram estatisticamente equivalentes ao teste padrão *in vivo* (Tab. 6).

As vantagens da padronização desse teste, utilizando-se um modelo indicador de citotoxicidade *in vitro* para toxina épsilon, estão em observar e estudar a atividade biológica da toxina, o que não é possível com outras técnicas como ELISA e IDGA. Além disso, a linhagem MDCK, os meios e reagentes químicos, encontram-se disponíveis no mercado.

A utilização da SN *in vitro* na avaliação de potência de vacinas que contém toxóide épsilon, evitará o uso de animais, como modelos indicadores de letalidade e dermonecrótico. A observação da ação biológica da toxina épsilon em linhagem MDCK oferece um indicador alternativo válido para titulações de anti-toxina épsilon.

5. CONCLUSÕES

O método padronizado *in vitro* com a utilização da equação matemática $ECT = 0,31 - 0,23 \times FC$ pode ser usado na titulação de sobrenadantes de culturas toxigênicas de *Clostridium perfringens* tipo D.

O teste de SN *in vitro* padronizado em linhagem celular, pode ser usado como um método alternativo a SNC para a avaliação de potência de toxóides épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. Rio de Janeiro: EDUR, 2000. 353p.
- AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 50, n. 3, p. 239-242, 1998.
- BATTY, I.; GLENNY, A. T.; Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxins and antitoxins. *Brit. J. Exp. Pathol.*, v. 27, n. 10, p.110-126, 1947.
- BEH, K. J.; BUTTERY, S. H. Reverse phase passive haemagglutination and single radial immunodiffusion to detect epsilon antigen of *Clostridium perfringens* type D. *Aust. Vet. J.*, v. 54, n. 11, p. 541-544, 1978.
- BENNETS, H. W. Infectious enterotoxemia (the so-called braxy-like disease) of sheep in western Australia. *Bull. Coun. Sci. Ind. Res. Austral.*, n. 5, p. 222-225 v. 57, 1932.
- BORRMANN, E.; GUNTHER, H.; KOHLER, H. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immun. Med. Microbil.*, v. 31, n. 3 p. 85-92, 2001.
- BUXTON, D. Further studies on the mode of action of *Clostridium welchii* type D epsilon toxin. *J. Med. Microbil.*, v. 11, n. 6, p. 293-298, 1978.
- BUESCHEL, D. M.; HELEN JOST, B; BILLINGTON, S. J.; et al. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbil.*, v. 94, n. 13, p. 121-129, 2003.
- EL IDRISSEI, A. H.; WARD, G. E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Vet. Microbil.*, v. 31, n. 1, p. 89-99, 1992a.

- EL IDRISSE, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Vet. Microbiol.*, v. 31, n. 4, p. 389-396, 1992b.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 3. ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S. A., 1998. 363p. Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium.
- GIBERT, M.; JOVILET-REYNAUD, C.; POPOFF, M. R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v. 203, n. 11, p. 65-73, 1997.
- GLENNY, A. T.; LLEWE LLYN-JONES, M.; MANSON, J. H. The intracutaneous methods of testing the toxins and anti-toxin of the "Gas Gangrene" organism. *J. Patholol. Bact.*, v. 34, n. 9, p. 201-211, 1931.
- GLENNY, A. T.; BARR, M.; LLEWE LLYN-JONES, M.; et al. Multiple toxins produced by some organism of the *Bacillus*. *J. Pathol. Bact.*, v. 37, n. 2, p. 53-74, 1933.
- GRIFFITHS, G. D.; LINDSAY, C.; UPSHALL, D. G. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. *Toxicology*, v. 90, n. 6, p. 11-27, 1994.
- GRINNER, L. A.; BRACKEN, F. K. *Clostridium perfringens* (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 122, n. 3, p. 99-102, 1953.
- GRINNER, L. A.; AICHELMAN, W. W.; BROWN, G. D. *Clostridium perfringens* type D (epsilon) enterotoxemia in Brown Swiss Dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 15, p. 375-376, 1956.
- HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.
- HAVARD, H. L.; HUNTER, S. E.; TITBALL, R. W. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and type D. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 76, n. 15 p. 77-81, 1992.
- HEPPLE, J. R. Necrotic enterotoxemia in a calf due to *Clostridium welchii* type B. *Vet. Rec.*, v. 43, p. 64, n. 3, 1952.
- HUNTER, S. E. C.; BROWN, E. J.; OYSTON, P. C. F.; et al. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immunol.*, v. 61, n. 9, p. 3958-3965, 1993.
- JOVILET-REYNAUD, C.; POPOFF, M. R.; VINIT, M. A. et al. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* beta toxin and other clostridial toxins. *Zbl. Bakteriolog.*, v. 15, n. 6, p. 145-151, 1986.
- KENNEDY, K. K.; NORRIS, S. J.; BECKENHAUER, W. H.; WHITE, R. G. Antitoxin response in cattle vaccinated with *Clostridium perfringens* type C toxoids. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v. 72, n. 7, p.1213-1215, 1977a.
- KENNEDY, K. K., NORRIS, S. J., BECKENHAUER, W. H.; WHITE, R. G. Vaccination of cattle and sheep with a combined *Clostridium perfringens* type C and D toxoids. *Amer. J. Anim. Sci.*, v. 38, n. 5, p. 1515-1517, 1977b.
- KNIGHT, P. A.; BURNETT, C.; WHITAKER, A. M.; QUEMINET, J. The titration of clostridial toxoids and antisera in cell culture. *Dev. Biol. Stand.*, v. 64, p. n. 15, 129-136, 1986.
- KNIGHT, P. A.; QUEMINET, J.; BLANCHARD, J.; TILLERAY, J. H. In vitro test for the measurement of clostridial toxins, toxoids and antisera: II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biological.*, v. 18, n. 11 p. 263-270, 1990.
- KNIGHT, P. A.; TILLERAY, J. H.; QUEMINET, J. In vitro test for the measurement of veterinary Clostridial toxins, toxoids and antisera. I. Titration of

- Clostridium septicum toxins and antitoxins in cell culture. *Biological.*, v. 18, n. 6, p. 181-189, 1990.
- MACDONEL, J. L. Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol. Ther.*, v. 10, n. 13, p. 617-655, 1980.
- MACRAE, D. R.; MERRAY, E. G.; GRAND, J. G. Entero-toxemia in young suckled calves. *Vet. Rec.*, v. 55, n. 13, p. 203, 1943.
- MAHONY, D. E.; GILLIATT, S.; DAWSON, E. *et al.* Vero cell assay for rapid detection of Clostridium perfringens enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, n. 9, p. 2141-2143, 1989.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. *Immunological.* v. 21, n. 3, p. 260-264, 1971.
- MARTIN, P. K.; NAYLOR, R. D. A latex agglutination test for the detection of Clostridium perfringens epsilon toxin. *Res. Vet. Sci.*, v. 56, n. 16, p. 259-261, 1994.
- MARUCCI, A. A.; FULLER, T. C. Quantitative microcomplement fixation test. *Appl. Microbiol.*, v. 21, n. 3 p. 260-264, 1971.
- NASCIMENTO, R. A. P. *Avaliação da eficiência de vacinas contra Clostridium novyi tipo B.* 2003. 33f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. Distribution of labeled Clostridium perfringens epsilon toxin in mice. *Toxicon*, v. 29, n. 2, p. 211-217, 1991.
- NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from Clostridium perfringens. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 84, n. 10, p. 41-44, 1991.
- NAGAHAMA, M.; HAYASHI, H.; MORIMITSU, S.; SAKURAI, J. Biological actives and pore formation of Clostridium perfringens beta toxin in HL 60 cells. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 38, p. 36934-36941, 2003.
- NAYLOR, R. D.; MARTIN, P. K.; SHARPE, R. T. Detection of Clostridium perfringens epsilon toxin by ELISA. *Res. Vet. Sci.*, v. 42, n. 9, p. 255-256, 1987.
- NILO, L. Bovine enterotoxemia. III. Factors affecting the stability of the toxins of Clostridium perfringens type A, C, D. *Can. Vet. J.*, v. 6, n. 7, p. 38-42, 1965.
- NILO, L. Clostridium perfringens in animal diseases: a review of current knowledge. *Can. Vet. J.*, v. 21, n. 5, p. 141-148, 1980.
- PAYNE, D. W.; WILLIAMSON, E. D.; HAVARD, H. *et al.* Evaluation of a new cytotoxicity assays for Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 116, n. 6, p. 161-168, 1994.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D. *et al.* Clostridium perfringens epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriol.*, v. 179, n. 20, p. 6480-6487, 1997.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- ROSE, A. L.; EDGAR, G. Enterotoxemia jaundice of sheep and cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 12, n. 4, p. 212, 1936.
- ROTH, F.; JANSEN, K.; PETZKE, S. Detection of neutralizing antibodies against α -toxin of different Clostridium septicum strains in cell culture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 24, n. 7, p. 353-359, 1999.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. Purification of beta-toxin from Clostridium perfringens type C. *Infect. Immunol.*, v. 18, n. 3, p. 741-745, 1977.

- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. Some properties of beta-toxin produced Clostridium perfringens type C. *Infect. Immunol.*, v. 21, n. 2, p. 678-680, 1978.
- SAKURAI, J.; FUJII, Y.; MATSURA, M.; ENDO, K. Pharmacological effect of beta toxin of Clostridium perfringens type C on rats. *Microbiol. Immunol.*, v. 25, n. 5, p.423-432, 1981.
- SAKURAI, J.; FUJII, Y.; DEZAKI, K. et al. Effect of Clostridium perfringens beta toxin on blood pressure of rats. *Microbiol. Immunol.*, v. 28, n. 1, p. 23-31, 1984.
- SAKURAI, J.; FUJII, Y. Purification and characterization of Clostridium perfringens beta toxin. *Toxicon*, v. 25, n. 12, p. 1301-1310, 1987.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; OCHI, S. Major toxins of Clostridium perfringens. *J. Tox. Rev.*, v. 16, n. 14 p. 195-214, 1997.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; HISATSUME, J. et al. Clostridium perfringens iota-toxin, ADP-ribosyltransferase: structure and mechanism of action. *Advan. Enzyme Regul.*, v. 43, n. 7, p. 361-377, 2003.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SCHWARTZ, J. L.; HAMILTON, J. P.; FEKETY, R.; et al. Ampicilin-induced enterocolitis: implication of toxigenic Clostridium perfringens type C. *J. Pediatr.*, v. 97, n. 13, p. 661-663, 1980.
- SEBALD, M.; PETIT, J. C. Group identification. In:_____. *Laboratory methods anaerobic and their identification*. 2.ed. Paris: Institute Pausteur, 1997. p.189-197.
- SEVERIN, W. P. J.; DE LA FUENT, A. A.; STRINGER, M. F. Clostridium perfringens type C causing necrotizing enteritis. *J. Clin. Pathol.*, v. 36, n. 2, p.942-944, 1984.
- SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; et al. Clostridium perfringens beta-toxin forms potencial-depedent, cation-seletive channels in lipid bilayers. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 10, p. 5546-5551, 2000.
- SHORTT, B. J.; TITBALL, R. W.; LINDSAY, C. D. An assessment of the *in vitro* toxicology of Clostridium perfringens type D E-toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxic.*, v. 19, p. 108-116, 2000.
- SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 2, p.216-234, 1996.
- STEINTHORSDOTTIR, V.; HALLDÓRSSON, H.; ANDRÉSSON, O. S. Clostridium perfringens beta toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microbiol. Pathog.*, v. 28, p.45-50, 1999.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic clostridia*. London, England: Butterworth, 1975. 143p.
- STILES, B. G.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of Clostridium perfringens iota toxin: dependence on two nonliked proteins for biological activity. *Infect. Immunol.*, v. 54, n. 8, p. 683-688, 1986.
- TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The Clostridium perfringens α -toxin. *Anaerobic.*, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1999.
- UZAL, F. A.; ROLFE, B.E.; SMITH, N. J.; THOMAS, A. C.; KELLY, W. R. Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to Clostridium perfringens type D epsilon toxin in vitro. *Vet. Res. Commun.*, v. 23, n. 9, p. 275-284, 1999.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; MORRIS, W. E.; ASSIS, R. A. Effects on intravenous injection of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in calves. *J. Comp. Pathol.*, v. 126, n. 14, p. 71-75, 2002.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; THOMAS, R. et al. Comparison of four techniques type D

epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Invest.*, v. 15, n. 16, p. 94-99, 2003.

UZAL, F. A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobic*. v. 10, n. 11, p. 135-13, 2004.

WEDDELL, W.; WORTHINGTON, R. W. An enzyme labeled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contents. *N. Z. Vet. J.*, v. 33, n. 9, p. 36-37, 1984.

WELCH, W. H.; NUTTALL, G. H. F. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*) capable of development in the

blood vessels after death. *Bull. Hopkins Hosp.*, v. 3, n. 7, p. 81-91, 1892.

WHITE, D. J.; SEAMAN C. LLC-RK1 cell screening test for nephrotoxicity. In. O'HARE, S., ATTERWILL, C. K. (Eds.) *Methods in molecular biology: in vitro toxicity testing protocols*. Totowa, N. J: Humana Press, 1995. Cap.2, p.11-15.

WOOD, K. R. An alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency testing of *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* type B and *Clostridium perfringens* type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biological.*, v. 19, p. 281-286, 1991.