

T 636.039 68
C 331e

2004

Augusto Vinícius Arruda de Carvalho



ELISA sanduíche para detecção de toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C.

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Professor Francisco Lobato

Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine.

Belo Horizonte – MG
UFMG – Escola de Veterinária
2004

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

06/12/04

DA UFMG

2218904-01

363730

C331e Carvalho, Augusto Vinícius Arruda de, 1975-
ELISA sanduíche para detecção de toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C. / Augusto Vinícius Arruda de Carvalho. - 2004.
39p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Empene

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

Bibliografia: p.

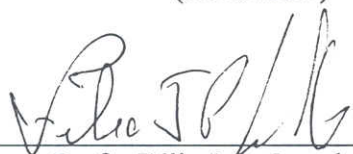
1. *Clostridium perfringens* – Teses, 2. *Clostridium* - Toxinas - Teses. 3. Teste imunoenzimático - Teses. 4. Enterotoxemia - Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria, 1954- II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 616.931


Dissertação defendida e aprovada em 14 junho de 2004, pela Comissão Examinadora constituída por:



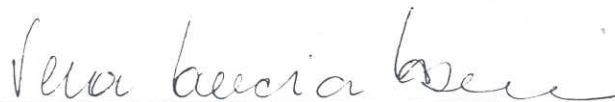
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
(Orientador)



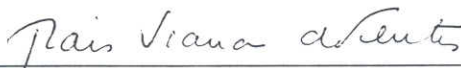
Profa. Zélia Inês Portela Lobato



Prof. Andrey Pereira Lage



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Dra. Thaís Viana de Freitas

Dedico este trabalho a minha mãe,
Marlene Arruda de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar que é a quem recorremos no primeiro sinal de dificuldade.

A minha esposa Vanessa que em momento algum duvidou ou deixou de me apoiar nestes anos e principalmente nos momentos finais deste trabalho.

Ao meu Pai por tudo que me foi concedido e principalmente pelo exemplo de honestidade e competência que representa. A Ariana, Daniel, Alana, Flávio e Alessandra.

Aos meus orientadores Francisco Lobato e Luiz Heneine por terem me recebido e pela confiança depositada.

Aos poucos melhores amigos que temos na vida, Zuleica e em especial Liliane que guiou meus primeiros passos no laboratório.

A todos os amigos em especial, Nelson, Ronnie, Patrícia Cota, Patrícia Parreiras e Álvaro que me passaram grande parte do conhecimento adquirido nestes anos de mestrado.

Ao colegiado de Pós-Graduação, na pessoa da professora Lygia Maria Friche Passos, pela compreensão e ajuda prestada.

Ao Vallée S.A. pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio técnico fornecido.

Aos amigos do LARA/PL, na pessoa do Dr. Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, pelo apoio na realização deste experimento.

A Professora Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela ajuda na etapa final, que com certeza foi a mais difícil.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. LITERATURA CONSULTADA	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Local de realização do experimento	16
3.1.2. Toxinas e antitoxinas.....	16
	17
3.2. Produção e purificação de toxinas	17
3.2.1. Amostra de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C	17
3.2.2. Meios de Cultura	17
3.2.3. Preparo do inoculo e avaliação da pureza da amostra	17
3.2.4. Produção e concentração da toxina beta	17
3.2.5. Teste de toxicidade em camundongos da toxina beta produzida	17
3.2.6. Confirmação do tipo de toxina produzida	18
3.2.7. Titulação de toxinas	18
3.2.8. Purificação da toxina beta	18
3.2.8.1. Dosagem de proteína	18
3.2.8.2. Eletroforese	19
3.2.8.3. Coloração do gel	19
3.2.9. Teste de toxicidade em camundongos da toxina beta putificada	19
3.2.9.1. Destoxificação da toxina beta purificada	19
	19
3.3. Produção de antitoxina beta	19
3.3.1. Avaliação dos soros-hiperimunes	20
3.3.2. Purificação da IgG de carneiro antitoxina beta	20
3.3.3. Produção do conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta	20
3.3.4. Titulação e avaliação da especificidade do conjugado de IgG de carneiro antitoxina Beta	20
3.4. Amostras negativas de conteúdo intestinal	21
3.5. ELISA sanduíche para detecção de toxina beta produzida pelo <i>C. perfringens</i> Tipos B e C	21
3.5.1. Determinação das diluições da imunoglobulina de carneiro, antígeno e conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta	21
3.5.2. Avaliação da especificidade do ELISA sanduíche	21
3.5.3. ELISA sanduíche para detecção da toxina beta em conteúdo intestinal	22
3.5.4. Comparação do limite de detecção de toxina beta entre o ELISA sanduíche e o teste de toxicidade em camundongos	22

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1.	Avaliação da pureza da amostra	22
4.2.	Titulação da toxina beta produzida e da toxina beta "Vallée"	22
4.2.1.	Teste de toxicidade em camundongos e avaliação do tipo de toxina produzida	22
4.2.2.	Dosagem de proteína	23
4.2.3.	Purificação da toxina beta	23
4.2.4.	Teste de toxicidade da toxina beta purificada	29
4.3.	Avaliação dos soros-hiperimunes	29
4.3.1.	Purificação, avaliação e conjugação da imunoglobulinas de carneiro	31
4.4.	Amostras negativas de conteúdo intestinal	34
4.5.	Detecção de toxina beta pelo ELISA sanduíche	35
4.5.1.	Comparação do limite de detecção de toxina beta entre o ELISA sanduíche e o teste de toxicidade em camundongos	36
5.	CONCLUSÕES	37
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Doenças produzidas pelos tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i>	14
Tabela 2.	Resultados das quantidades de toxina beta purificadas pela coluna de afinidade metálica em dias diferentes.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela Prata, para visualização da banda referente ao peso molecular da toxina beta. (1) Padrão pré-corado de alto peso molecular, (2) Toxina bruta, (3) Toxina diluída 1:10, (4) Toxina diluída 1:50	24
Figura 2.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela prata das frações coletadas de diferentes tubos nas primeiras tentativas de se purificar a toxina beta produzida e concentrada através do método da cromatografia por afinidade metálica.....	24
Figura 3.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela Prata De toxina beta purificada por coluna de afinidade metálica . (1) padrão pré-corado de alto peso molecular, (3) Toxina beta padrão, (4, 5, 6 e 7) amostras coletadas dos primeiros tubos após a passagem de um volume de coluna, (8, 9, 10 e 11) amostras coletadas após a troca para o tampão de eluição recomendado pela técnica, (12, 13, 14, 15) amostras coletadas após passagem de dois volumes de coluna do tampão de eluição	25

- Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela Prata das frações coletadas após a troca para o tampão de eluição na cromatografia de imunoafinidade. A figura evidencia a presença de uma banda de peso molecular de aproximadamente 36,453kDa da toxina beta, forma monomérica, e bandas de pesos moleculares superiores referentes às formas oligoméricas da toxina beta. (1) Padrão de alto peso molecular. (2 e 3) frações 4 e 5 cromatografia 1. (4, 5 e 6) frações 3,4 e 5 cromatografia 2. (7, 8 e 9) frações 3, 4 e 5 cromatografia 3. (10, 11 e 12) frações 3, 4 e 5 cromatografia 4. (13) fração 3 cromatografia 5..... 27
- Figura 5. “Western blot” mostrando a presença da toxina beta nas formas oligoméricas, peso molecular superior aos 38 Kda da forma monomérica, reconhecida pelo conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta. (1) Padrão de peso molecular pré-corado; (2) 1,0µg de toxina beta purificada e iodada em PBS 0,1 M; (3-6) 2,5µg de toxina beta purificada e iodada em PBS 0,1 M 29
- Figura 6. Avaliação por ELISA indireto dos soros hiperimunes produzidos em carneiros obtidos após quatro inoculações com toxóide beta. As placas foram sensibilizadas com 1,0µg/mL de toxina beta purificada pelo método da imunoafinidade e iodada ... 31
- Figura 7. Gráfico ilustrando a purificação da IgG de carneiro antitoxina beta com a utilização da coluna de imunoafinidade, frações de 2,0 mL coletadas após a troca para o tampão de eluição 32
- Figura 8. ELISA indireto mostrando a titulação do conjugado de IgG de carneiro antibeta Toxina. A placa foi sensibilizada com 1,0µg/mL de toxina beta purificada e iodada e 100µg/mL de albumina bovina 33
- Figura 9. ELISA sanduíche mostrando a especificidade para a detecção da toxina beta frente à toxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D. As Placas foram sensibilizadas com 1,0µg/mL de IgG de carneiro antitoxina beta purificada, adicionou-se uma curva de toxina beta purificada e iodada na concentração inicial de 2,5µg/mL e uma curva de toxina epsilon purificada e iodada também na concentração inicial de 2,5µg/mL. Conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta foi utilizado na diluição de 1:25.000 34
- Figura 10. ELISA direto mostrando não haver interferência do conteúdo intestinal coletado com o teste proposto para a detecção da toxina beta. Placas sensibilizadas com 1,0µg/mL de IgG de carneiro antitoxina beta purificada. Foi adicionada uma curva padrão de toxina beta purificada e iodada na concentração inicial de 2,5µg/mL, e os conteúdos intestinais filtrado e não filtrado foram adicionados na diluição inicial 1:2. Conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta foi utilizado na diluição de 1:25.000 34
- Figura 11. Detecção da toxina beta purificada e iodada pelo ELISA sanduíche em PBS 0,1 M + 0,05% de tween 20 e em conteúdo intestinal diluído 1:8. As curvas de toxina beta tiveram como concentrações iniciais 2,5µg/mL 35

Figura 12. Titulação por ELISA sanduíche das diluições usadas no teste de toxicidade em camundongos, conteúdo intestinal contaminado artificialmente com toxina beta não purificada na concentração inicial de 25 DMM/mL em diluição seriada com fator de diluição 2 até 0,003 DMM/mL 36

RESUMO

Padronizou-se o teste de ELISA sanduíche para a detecção da beta toxina produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C. A toxina beta foi purificada pelos métodos da afinidade metálica e imunoafinidade e destoxificada pelo método da iodação controlada para a produção de imunoglobulinas e conjugado de IgG de carneiro antibeta toxina. O ELISA sanduíche mostrou-se sensível detectando 2,44ng/mL de toxina beta purificada em PBS e em conteúdo intestinal. Quando comparado com o teste de toxicidade em camundongos o ELISA mostrou ser 1000 vezes mais sensível, detectando 0,01 DMM/mL de toxina beta não purificada em conteúdo intestinal artificialmente contaminado.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*, toxina beta, ELISA sanduíche.

ABSTRACT

An ELISA test was developed and standardized to detect beta toxin produced by the *Clostridium perfringens* types B and C. The beta toxin was purified by metal affinity chromatography and immunoaffinity chromatography and detoxified by the method of controlled iodination. Anti-toxin IgG raised in sheep were purified on a beta toxin affinity column and conjugated to horse radish peroxidase. The sandwich ELISA detected 2.44 ng/ml of the purified beta toxin in PBS buffer and intestinal content. The ELISA compared favourably to the toxicity test in mice, showing an 1000 fold higher sensitivity, detecting 0,01 DMM/mL, of nonpurified beta toxin in intestine content artificially contaminated.

Key words: *Clostridium perfringens*, beta toxin, sandwich ELISA.

INTRODUÇÃO

As clostridioses compreendem um grupo de infecções e intoxicações causadas por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*. Estes microorganismos representam um risco significativo à população humana e animal por esporularem quando submetidos a condições adversas, mantendo-se potencialmente infectantes no solo por longos períodos.

Clostridium perfringens pode ser encontrado como integrante da microbiota normal do trato digestivo do homem e dos animais. A multiplicação bacteriana resulta na produção de toxinas. São produzidos quatro principais tipos de toxinas conhecidas como alfa, beta, epsilon e iota, que determinam a classificação do *Clostridium perfringens* em tipos A, B, C, D e E. A toxina alfa está presente em maior quantidade no tipo A e em menor quantidade em todos os outros tipos. O tipo B produz beta e epsilon toxinas, o tipo C produz beta toxina, o tipo D produz epsilon toxina e o tipo E produz iota toxina.

A proliferação bacteriana anormal, no trato intestinal dos ruminantes, com produção e absorção de grandes quantidades de toxina, leva ao desenvolvimento de quadros conhecidos como enterotoxemias. Quadros esses normalmente associados a fatores predisponentes como alteração brusca da alimentação. O fornecimento de dietas ricas em carboidratos e pobres em fibras, e a sobrecarga alimentar promovem alterações na microflora ruminal permitindo a passagem de alimentos não digeridos para o intestino delgado, havendo então estabelecimento de ambiente favorável à rápida proliferação do agente, Niilo (1980).

As enterotoxemias causadas pela beta toxina, produzida por *Clostridium perfringens* tipos B e C, e epsilon toxina produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D devem ser destacadas, pois podem levar a

óbito os animais acometidos. São acometidos principalmente animais de três dias a seis meses de idade. A doença também tem sido descrita em animais adultos (Sigurdarson e Thorsteinsson, 1990; Silveira et al., 1995).

Nos últimos anos no Brasil, houve um incremento na produção e comercialização de vacinas contra clostridioses que contém em sua formulação toxóides beta e epsilon. O país possui um efetivo bovino da ordem de 171 milhões, 12 milhões de caprinos e 18 milhões de ovinos (Sincorte 2003), é hoje um dos principais mercados consumidores de vacinas contra clostridioses no mundo. Somente na década de 90 foram produzidas, no Brasil, um bilhão cento e noventa e três milhões de doses de vacinas contra clostridioses (Nascimento, 2003).

O diagnóstico da enterotoxemia é feito a partir da análise de históricos, achados clínicos, achados de necropsia e exames laboratoriais, que consistem no isolamento do agente e detecção da toxina presente em material clínico, em especial conteúdo intestinal. Para a detecção da toxina em conteúdo intestinal a técnica reconhecida mundialmente é a soroneutralização em camundongos, o que torna o diagnóstico bastante dispendioso e tem gerado inúmeras discussões no campo da bioética pelo uso de animais nesses testes.

Apesar do elevado número de vacinas comercializadas no Brasil, existem poucos laboratórios de diagnóstico capazes de realizar com segurança a detecção da toxina, assim a grande maioria dos diagnósticos de campo é feita sem comprovação laboratorial. A vacinação, desde que realizada com vacinas comprovadamente eficientes, é a forma de profilaxia indicada para se evitar os prejuízos econômicos causados pelas doenças clostridiais, pois os animais estão sujeitos a infecção em todas as etapas de sua vida produtiva (Lobato et al., 2000).

A ausência de diagnósticos definitivos respaldados por exames laboratoriais confiáveis não permite avaliar com segurança a situação da doença no Brasil e nem tão pouco justificar o grande número de antígenos constituintes das polivacinas e o consumo exagerado desses imunógenos.

Este trabalho teve como objetivo padronizar um teste "in vitro" ELISA sanduíche para detectar a presença da toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C. Podendo futuramente ser utilizado como alternativa no diagnóstico da enterotoxemia.

2 LITERATURA CONSULTADA

Clostridium perfringens é classificado em cinco tipos toxigênicos A, B, C, D e E. Esta classificação foi baseada primeiramente na presença de toxina ou toxinas alfa, beta, epsilon e iota, letais para camundongos, em sobrenadantes de cultura, e na neutralização desta letalidade por anticorpos gerados contra estas toxinas (Sterne e Warrack, 1964). Na figura 1 são apresentados os tipos de *Clostridium perfringens*, suas toxinas principais e as doenças causadas por este agente.

Tabela 1: Doenças produzidas pelos tipos toxigênicos de *C. perfringens**

Tipos de <i>C. perfringens</i>	Principal toxina presente	Doenças associadas
A	α	Mionecrose, intoxicação alimentar, enterite necrótica em aves, enterotoxemia em bovinos e cordeiros, enterocolite necrotizante em leitões, possivelmente colite eqüina, gastroenterite hemorrágica canina.
B	α, β, ϵ	Desintéria dos cordeiros recém nascidos, enterite crônica em cordeiros mais velhos, enterite hemorrágica em bezerras e potros e enterotoxemia hemorrágica em ovinos.
C	α, β	Enterite necrótica (pigbel) em humanos, enterotoxemia hemorrágica ou necrótica em bezerras, potros, cordeiros, leitões e cabritos neonetais e enterotoxemia aguda (Struck) em ovinos adultos.
D	α, ϵ	Enterotoxemia em cordeiros (doença do rim pulposo) e bezerras, enterocolite em caprinos recém nascidos e adultos, possivelmente enterotoxemia em bovinos adultos.
E	α, ι	Enterotoxemia em bezerras e cordeiros, enterite em coelhos.
A-E	Enterotoxina	Enterite canina e suína, possivelmente enterite bovina e eqüina.

* Dados extraídos e adaptados de Songer (1996).

Clostridium perfringens tipo C foi descrito por McEwen em 1930 quando investigava um surto de enterotoxemia em ovinos adultos conhecido como "Struck", a bactéria recebeu primeiramente o nome de *Bacillus*

paludis sendo posteriormente denominada como *Clostridium perfringens* tipo C (Pivnick et al., 1963).

A enterotoxemia causada pela beta toxina quando de curso agudo, apresenta pouco ou nenhum sinal clínico, já quando o curso da

doença ultrapassa 24 horas são freqüentes achados como mucosa intestinal enegrecida, sangramento na cavidade abdominal e em cursos mais crônicos ocorre até despreendimento da mucosa intestinal. Todos os quadros estão associados à intensa dor abdominal (Songer, 1996).

As toxinas alfa e beta de *Clostridium perfringens* são sensíveis à ação de enzimas proteolíticas. A tripsina é capaz de reduzir em 100% a letalidade da toxina beta quando é adicionada a ela e incubada por 30 minutos a 37 °C (Sakurai e Duncan, 1978). A maior susceptibilidade de animais neonatos a ação das toxinas alfa e beta pode ser explicada pela presença no colostro e no leite de fatores inibidores de tripsina nos primeiros cinco dias após seu nascimento (Azevedo et al., 1998).

Quanto ao mecanismo de ação da beta toxina, pouco se conhecia até que Hunter et al. (1993), após análise molecular do gene que a codifica, revelarem haver homologia com a alfa toxina, gama toxina e leucocidina do *Staphylococcus aureus* que são toxinas formadoras de poros, sugerindo assim um possível mecanismo de ação da toxina beta. Sintomas como opistótono e tetania que antecedem a morte do animal sugerem envolvimento neurológico (Songer, 1996). A formação de canais condutores de cátions em células susceptíveis, sem necessariamente haver lise celular foi relatada por Shatursky et al. (2000), aventando a possibilidade da letalidade da toxina beta ser resultado da perturbação direta da distribuição de cátions através das membranas de células associadas ao sistema nervoso.

A importância da toxina beta tem sido demonstrada com a redução da severidade da doença e até mesmo diminuindo a mortalidade, através de estudos de imunizações usando o toxóide beta. A vacinação contra infecções causadas pelo *Clostridium perfringens* tipo C é universalmente difundida a fim de se evitar

as grandes perdas econômicas causadas pela doença (Songer, 1996).

Pivnick et al. (1963) definiram a quantidade de toxina beta produzida como sendo dependente de três fatores: a amostra, o meio de cultura e as condições de crescimento. O controle do pH permitiu um aumento significativo no título da toxina beta produzida de 6.000 DMM para até 140.000 DMM, aumentando também a estabilidade da toxina. Segundo Jorge (2003) quando há queda no pH durante a produção de toxina botulínica observa-se uma diminuição da quantidade de toxina produzida por uma paralização do crescimento dos *Clostridium botulinum* tipos C e D, e o contrário foi observado quando o pH foi controlado automaticamente.

Durante o processo de produção de toxina são liberados no meio os produtos do metabolismo anaeróbico, moléculas orgânicas pequenas e voláteis tais como; ácidos orgânicos e álcoois. O acúmulo destes produtos causa a inibição do crescimento bacteriano e em concentrações muito altas toda a atividade microbiana é interrompida. A produção de toxina botulínica em fermentadores com fluxo contínuo de nitrogênio, provou ser eficiente na remoção destes produtos voláteis favorecendo o crescimento bacteriano e conseqüentemente levando a um aumento da quantidade de toxina produzida (Mozzer, 2004).

Muitos testes "in vitro" vêm sendo desenvolvidos numa tentativa de substituição do método de soroneutralização em camundongos, adotado ainda hoje, para o diagnóstico da enterotoxemia e avaliação da potência de vacinas, destacando-se o ensaio imunoenzimático ligado a uma enzima (ELISA) sanduíche (Naylor et al., 1987; Nagahama et al., 1991; Wood, 1991; El Hidrissi e Ward, 1992a; El Hidrissi e Ward, 1992b; Uzal et al., 1997; Brane, 1999; Parreiras, 2001; Uzal et al., 2003).

Dificuldades no diagnóstico das enterotoxemias em animais podem estar relacionadas à inativação das toxinas no conteúdo intestinal após a morte do animal. Fermentação, mudanças no pH, composição e temperatura do conteúdo intestinal podem contribuir na ativação, preservação ou destruição das toxinas (Niilo, 1965).

A necessidade do desenvolvimento de testes para substituir a soroneutralização deve-se ao fato que embora este seja reconhecido como sensível, ele é lento e pode ser em parte impreciso, pois pode haver variação quanto à sensibilidade de cada animal e presença de toxicidade inespecífica causada por outras substâncias que podem estar presentes em amostras clínicas, em especial de conteúdo intestinal (Naylor et al., 1987). Outro fator de grande relevância nesta busca para a substituição do teste de soroneutralização é o custo em razão do uso de um grande número de animais (Wood, 1991).

O teste de ELISA pode ser de 10 a 1000 vezes mais sensível que a soroneutralização em camundongos como descrito por Nagahama et al. (1991). Razão pela qual o uso do ELISA para teste de potência de vacinas contra *Clostridium botulinum* já está previsto pela British Pharmacopeia (1998) e o ELISA para controle do toxoide tetânico - CFR - já está implementado.

Segundo Nagahama et al. (1991) a sensibilidade do ELISA com anticorpos específicos para detecção da beta, epsilon e iota toxinas de *Clostridium perfringens* pode chegar a 1,0ng/mL para toxinas beta e iota purificadas e 0,1ng/mL de toxina epsilon purificada. El Hidrissi e Ward (1992a) conseguiram detectar 2,0ng/mL de toxina epsilon purificada em PBS acrescido de 0,05% de Tween 20.

A comparação entre o ELISA sanduíche para detecção da beta e epsilon toxinas, em conteúdo intestinal, e a soroneutralização

mostrou sensibilidade e especificidade de 90,5% e 89,2% para a toxina beta e 97,4% e 94,6% para a toxina epsilon (El Hidrissi e Ward, 1992b).

Uzal et al. (2003), relataram ter conseguido detectar no ELISA sanduíche com anticorpos policlonais 0,075 DL₅₀/mL de toxina epsilon em conteúdo intestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no laboratório de Doenças Bacterianas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (LARA - PL) em Pedro Leopoldo.

3.1.1. Animais utilizados

Camundongos de ambos os sexos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 e 22 gramas, fornecidos pelo LARA - PL e biotério da FUNED.

Carneiros, adultos, da raça Santa Inês fornecidos pelo LARA - PL.

3.1.2. Toxinas e antitoxinas

Antitoxina beta padrão, produzida em equino contendo 1020 unidades internacionais por ampola, e toxina beta padrão adquiridas junto ao National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) da Inglaterra.

Toxina beta concentrada 20 vezes gentilmente fornecida pelo laboratório Vallée S.A.

3.2. Produção e purificação de toxinas

3.2.1. Amostra de *Clostridium perfringens* tipo C

A toxina beta foi produzida a partir de uma amostra liofilizada de *Clostridium perfringens* tipo C fornecida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) – Bariloche, Argentina.

3.2.2. Meios de cultura

Para avaliação da pureza da amostra e produção de toxinas foram empregados os seguintes meios de cultura: Caldo tioglicolato, Agar sangue com 5% de sangue de equino, Agar Sahid Ferguson Perfringens (SFP) e meio para produção de toxinas (MPT) (Uzal et al., 2000).

3.2.3. Preparo do inóculo e avaliação da pureza da amostra

Para o preparo do inóculo a amostra liofilizada fornecida pelo INTA foi reconstituída com 1,0 mL de caldo tioglicolato e transferida para dois tubos de ensaio com tampa de rosca contendo cada um 10,0 mL de caldo tioglicolato e incubados por 18 horas a 37 °C. Ao final deste período, depois de observado crescimento bacteriano caracterizado por intensa produção de gás e turvação do meio, amostras das culturas foram semeadas em placas de Agar sangue com 5% de sangue de equino e em placas de Agar SFP e incubadas em anaerobiose a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento em meio sólido, colônias características de *Clostridium perfringens* foram semeadas novamente em tubos contendo 10,0mL de caldo tioglicolato e incubadas em anaerobiose por 24 horas a 37 °C, para servirem de inóculos na produção de toxina. Todas as incubações foram feitas em jarra de anaerobiose com mistura gasosa contendo 10% de CO₂, 10% de H₂ e 80% de N₂.

3.2.4. Produção e concentração da toxina beta

Para a produção de toxina beta os inóculos foram transferidos para um erlemeyer contendo 450ml de meio para produção de toxina (MPT) na proporção de 10% v/v e incubados em anaerobiose por oito horas a 37 °C.

Após o período de incubação a cultura em MPT foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada (Sorvall, U.S.A.). O sobrenadante da cultura foi concentrado a 10% do volume inicial com o auxílio do sistema de filtração Amicon (Millipore) a 4°C, utilizando membrana de retenção de 10 Kda e as frações concentradas foram mantidas a -80°C, até que fosse obtido volume suficiente para a purificação de toxina beta. Foi retirada uma amostra De cada fração para posterior confirmação do tipo de toxina produzida.

Em seguida, de acordo com a metodologia proposta por Sakurai e Fujii (1987) acrescentou-se, sob agitação lenta, sulfato de amônio (313g/L) ao sobrenadante concentrado na proporção de 1:2 e a mistura foi mantida durante a noite a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g a 4°C, por 20 minutos e o precipitado sedimentado foi ressuspenso em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,7) contendo 0,5M de NaCl e dialisado contra o mesmo tampão com o auxílio de membrana de diálise com capacidade de retenção superior a 12 kDa.

3.2.5. Teste de toxicidade em camundongos da toxina beta produzida

Para a realização do teste de toxicidade duas alíquotas de toxina beta foram separadas, sendo uma acrescida de 10µl de solução de tripsina a 1%, ambas foram mantidas em estufa a 37 °C por 30 minutos, em seguida 0,2mL foram inoculados via endovenosa em quatro camundongos para cada preparação.

Os animais foram observados por 72 horas.(Sakurai e Duncan, 1978).

3.2.6. Confirmação do tipo de toxina produzida

Para a confirmação do tipo de toxina produzida foi realizado o teste de soroneutralização em camundongos:

Para a realização da soroneutralização foram preparadas misturas de 1,0mL de toxina beta contendo 20 DMM/mL (dose mínima mortal, menor quantidade de toxina que mata 100% dos animais inoculados) com 1,0mL da antitoxina homóloga contendo 2,0 UI/ml e 1,0 mL de toxina beta contendo 20 DMM/mL com 1,0 ml de antitoxina epsilon contendo 2,0 UI/mL. Após 30 minutos a 37 °C foi administrado 0,2mL por via endovenosa em quatro camundongos para cada preparação. Os animais foram observados por 72 horas. Como controle foram feitas inoculações semelhantes de toxina beta sem adição de antitoxina. O tipo de toxina foi determinado pela sobrevivência dos camundongos inoculados com a mistura de toxina e antitoxina homóloga.(Batty e Glenny, 1947).

3.2.7. Titulação de toxinas

As toxinas beta produzida e recebida do Vallée S.A. foram tituladas utilizando-se diluições duplas de toxina beta em água peptonada a 1%, para determinação da DMM, para cada diluição foram inoculados dois camundongos pesando entre 17 e 22 gramas, com 0,2mL por via endovenosa. Os animais foram observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida uma vez e os resultados dos dois testes agrupados para efeito de cálculo da DMM (European Pharmacopeia, 1998).

3.2.8. Purificação da toxina beta

Para a purificação da toxina beta foram adotados dois métodos:

A toxina beta produzida, precipitada pelo sulfato de amônio e dialisada foi purificada pela cromatografia por afinidade metálica, descrito por Sakurai e Fujji (1987), realizado com o auxílio do sistema de cromatografia líquida de baixa pressão Pharmacia (Sweden), constituído de detector de luz ultravioleta no comprimento de onda de 280nm, registrador de cromatografia e coletor de fração, automáticos. Foram coletadas frações de 3,0mL em tubos contendo glicerol para uma concentração final de 20 % (v/v) de glicerol.

Na cromatografia por imunoafinidade as imunoglobulinas antitoxina beta foram fixadas a uma coluna de proteína G preparada conforme as instruções do fabricante (Amersham Bioscience). Nesse método a toxina recebida do Vallée S.A. foi aplicada diretamente na coluna, sem qualquer tratamento prévio, em tampão Tris 0,1M pH 8,0 e eluída através da passagem de solução de glicina 0,1M pH 2,5, as frações coletadas foram de 2,0 mL que também foram acrescidos de 20% (v/v) de glicerol. Todo o processo foi monitorado através de leitura espectrofotométrica a 280nm, este método foi uma adaptação da técnica utilizada por Parreiras (2001) para purificar anticorpos antitoxina epsilon.

Ao final das purificações as frações coletadas foram agrupadas por tipo de purificação, concentradas e dialisadas contra solução de glicerol a 20% (v/v) em água destilada com auxílio de célula de filtração Amicon (Millipore) com membrana de retenção de 10 kDa. As toxinas purificadas, concentradas e dialisadas foram alíquotadas e mantidas a -20°C.

3.2.8.1. Dosagem de proteína

Para a dosagem protéica da toxina beta purificada pela cromatografia de afinidade metálica foram utilizados o método descrito por Layne (1953) e o método do coeficiente de extinção descrito por Worthington et al.

(1973). Para a toxina beta purificada pelo método da cromatografia de imunoafinidade, utilizou-se o coeficiente de extinção (Worthington et al. 1973). A leitura da toxina a 280 nm foi dividida pelo coeficiente de extinção da toxina beta para este comprimento de onda que é 1,24 e o valor encontrado multiplicado pelo volume da toxina purificada.

3.2.8.2. Eletroforese

Toxina beta não purificada, purificada por afinidade metálica e purificada por imunoafinidade foram submetidas à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970).

O volume aplicado por canaleta foi de 19 μ L. Em todas as eletroforeses foram incluídos marcadores padrões de peso molecular (Sigma Chemical Company, St Louis, USA), pré-corados: δ -macroglobulin (193kDa), β -galactosidase (112 kDa), Frutose-6 phosphate kinase (86 kDa), Piruvate kinase (70 kDa), Fumarase (57 kDa), Lactic dehydrogenase (39,5 kDa) e Triosephosphate isomerase (36 kDa).

3.2.8.3. Coloração do gel

A coloração pela prata foi realizada de acordo com protocolo adotado pelo laboratório de imunologia da FUNED/MG. Após o término da eletroforese o gel foi lavado, rapidamente, em água destilada e colocado em solução fixadora (Metanol 30%, ácido acético 10% e água destilada 60%) por cinco minutos. Em seguida foi lavado em água destilada por cinco minutos. Após a lavagem foi imerso em solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), por cinco minutos. Lavado em água destilada por cinco minutos e corado com solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) por 20 minutos. Após este período foi lavado rapidamente em água destilada e a reação revelada com solução de carbonato de sódio 3% e formaldeído 0,05% até o aparecimento das

bandas desejadas. A reação foi interrompida com ácido acético 1% e em seguida o gel foi colocado em solução fixadora até o momento de sua secagem. Todas as etapas da coloração pela prata foram realizadas sob agitação lenta.

3.2.9. Teste de toxicidade em camundongos da toxina beta purificada

O teste de toxicidade foi realizado inoculando via endovenosa 0,2ml de toxina, em dois camundongos para cada diluição, utilizou-se fator de diluição dois e as quantidades de toxina foram de 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,75, 0,50, 0,25 μ g em água peptonada 1%.

3.2.9.1. Destoxificação da toxina beta purificada

Para a produção do toxóide, utilizado na produção de antitoxina beta, parte da toxina beta purificada pelo método da cromatografia por afinidade foi destoxificada pelo método da iodação controlada descrito por Heneine e Heneine (1998).

3.3. Produção de antitoxina beta

Para a produção de antitoxina beta foram hiperimunizados dois carneiros, testados previamente para a ausência de anticorpos contra toxina beta pela técnica de soroneutralização, com quatro doses crescentes do toxóide beta produzido conforme o item 3.2.9.1. As inoculações foram feitas por via subcutânea com intervalo de 21 dias:

1ª imunização: 100 μ g de toxoide beta + adjuvante Completo de Freund.

2ª imunização: 100 μ g de toxoide beta + adjuvante Incompleto de Freund.

3ª imunização: 400 μ g de toxoide beta + adjuvante Incompleto de Freund.

4ª imunização: 800 μ g de toxoide beta + adjuvante Incompleto de Freund.

Os carneiros foram sangrados no 14º dia após a última inoculação. A sangria foi feita pela veia jugular empregando tubos de 10mL com vácuo, sem anticoagulante.

3.3.1. Avaliação dos soros hiperimunes

Os soros obtidos foram separados por animal e avaliados por ELISA indireto para a presença de anticorpos da classe IgG antitoxina beta. As placas de ELISA foram sensibilizadas, com 1,0µg/mL de toxina beta purificada e iodada, durante a noite a 4°C. Diluições seriadas dos soros hiperimunes, com fator de diluição 2 de 1:100 até 1:51.200 e a partir daí com fator de diluição 1,3, foram adicionadas em duplicata aos poços das placas. Foi utilizado um conjugado antiIgG de carneiro comercial (Sigma), diluído conforme indicação do fabricante.

3.3.2. Purificação da IgG de carneiro antitoxina beta

Os anticorpos policlonais foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, preparada conforme instruções do fabricante (Amersham Bioscience), onde se utilizou toxóide beta como ligante, segundo a metodologia proposta por Parreiras (2001). Ao final da purificação as imunoglobulinas foram concentradas por liofilização. Avaliou-se a atividade das imunoglobulinas purificadas por ELISA indireto. Duas placas foram sensibilizadas, em dias diferentes, com 1,0µg/mL de toxina beta purificada e iodada, a imunoglobulina purificada foi adicionada à placa de ELISA, em duplicata, a partir de uma concentração inicial de 620µg/mL e foi feita diluição seriada com fator de diluição 2 até preencher todos os poços restantes. Para o controle do conjugado a imunoglobulina de carneiro foi substituída por PBS 0,1M pH 7,2 acrescido de 0,05% de Tween 20.

3.3.3. Produção do conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta

Parte da imunoglobulina purificada foi conjugada a horseradish peroxidase - HRP (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) pelo método modificado do m-periodato de sódio (Nakane e Kawaoi, 1974)

Dissolveu-se 5,0mg de HRP em 1,2 mL de água destilada. Adicionou-se 0,2mL de solução recém preparada de m-periodato de sódio 0,1 M (Sigma) à solução de peroxidase que tornou-se imediatamente verde. Misturou-se a solução lentamente, a temperatura ambiente, por 20 minutos ao abrigo da luz. A peroxidase foi submetida à diálise, durante a noite, contra um grande volume de tampão de acetato de sódio 1,0 mM, pH 4,0 a 4 °C.

No dia seguinte ressuspendeu-se 10mg da IgG de carneiro purificada em 1,0mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,02M, pH 9,5. Elevou-se o pH da peroxidase para 9,0 – 9,5 com adição de 40µL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2M, pH 9,5. Em seguida misturou-se a peroxidase e a IgG de carneiro lentamente por duas horas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 100µL de solução recém preparada de borohidreto de sódio 4mg/mL em água destilada. A mistura foi deixada em repouso por duas horas a 4 °C e foi submetida à diálise durante a noite contra um grande volume de tampão borato 0,1 M pH 7,4.

3.3.4. Titulação e avaliação da especificidade do conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta

A titulação e avaliação da especificidade do conjugado de carneiro antitoxina beta foram feitas através de ELISA indireto, foram testadas duas placas de ELISA em dias diferentes, as placas foram divididas ao meio, linhas A, B, C e D foram sensibilizadas com 1,0µg/mL de beta toxina

purificada e as linhas E, F, G e H foram sensibilizadas com 100µL de solução de albumina bovina na concentração de 100µg/mL. O conjugado foi adicionado em duplicata nas duas metades das placas a partir da diluição 1:500 até 1:128.000, sendo 2 o fator de diluição.

3.4. Amostras negativas de conteúdo intestinal

Foram coletados, em abatedouro com serviço de inspeção federal (SIF), 10 segmentos de intestino delgado de bovinos adultos saudáveis. Foi feito um "pool" dos conteúdos intestinais após a extração, o volume obtido foi diluído em igual volume de água peptonada 1% para redução de sua viscosidade, e centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C (Beckman J2-MC centrífuga, U.S.A.) e o sobrenadante foi separado cuidadosamente, parte do material foi filtrado 0,45µm e outra parte permaneceu sem filtração, as amostras foram mantidas a - 20 °C.

Os conteúdos intestinais foram submetidos aos testes ELISA sanduíche e toxicidade em camundongos, para avaliar a interferência. O teste de toxicidade foi realizado inoculando via endovenosa 0,2 mL de cada conteúdo em dois camundongos, e esses foram observados por 72 horas.

3.5. ELISA sanduíche para detecção da toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C.

3.5.1. Determinação das diluições da imunoglobulina de carneiro, antígeno e conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta.

Para a determinação das diluições da imunoglobulina de carneiro item 3.3.2 e do conjugado antitoxina beta, a serem utilizadas no ELISA sanduíche, três placas foram testadas em dias diferentes tendo sido sensibilizadas, cada uma, no dia anterior

com 2,5 e 1,0µg/ml de imunoglobulina de carneiro antitoxina beta, durante a noite a 4°C. As placas de ELISA foram lavadas duas vezes com solução de lavagem de ELISA - TSE (0,9% de NaCl, 0,05% de Tween 20 em água destilada, pH 7,2). Cada poço das placas foi bloqueado com 100µl de solução de albumina a 3% + 0,05% de Tween 20 por uma hora em estufa a 37 °C. Após este período as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem de ELISA - TSE e em seguida foi adicionado uma curva padrão, em duplicata, de toxina beta purificada pelo método da imunoafinidade e iodada em PBS 0,1M + 0,05% de Tween 20 com concentração inicial de 2,5µg/ml e feita uma diluição seriada com fator de diluição 2 até a concentração de 4,88 ng/ml, as placas permaneceram por mais uma hora em estufa a 37 °C. As placas então foram lavadas seis vezes com solução de lavagem de ELISA - TSE e foi adicionado 100µl por poço de solução de conjugado nas diluições 1:25.000 e 1:30.000 permanecendo as placas por mais uma hora em estufa a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem de ELISA - TSE e em seguida adicionou-se 100µl por poço de substrato enzimático (orto-fenilodiamino, OPD) com peróxido de hidrogênio em tampão citrato pH 5,0. A reação enzimática foi interrompida após 20 minutos de incubação em estufa a 37 °C com adição de 50µl de solução de ácido sulfúrico 1:20. A intensidade da reação foi determinada em leitor de ELISA (BIO RAD model 550, microplate reader) a 490nm.

3.5.2. Avaliação da especificidade do ELISA sanduíche

O ELISA sanduíche foi testado quanto a sua especificidade frente à toxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D, as placas de ELISA foram sensibilizadas com 2,5µg/mL de IgG antitoxina beta e foram adicionadas, em duplicata, curvas de

toxina epsilon e toxina beta purificadas e iodadas na concentração inicial de 2,5µg/mL. O protocolo dos ELISA foi o mesmo adotado para o item 3.5.1..

3.5.3. ELISA sanduíche para detecção de toxina beta em conteúdo intestinal

Definidas as diluições da imunoglobulina de carneiro antibeta toxina, da toxina beta purificada e iodada e do conjugado de carneiro antibeta toxina produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C, vários ensaios foram repetidos a fim de se padronizar o teste para a detecção de beta toxina em conteúdo intestinal. Com essa finalidade padronizou-se uma curva de toxina beta em conteúdo intestinal. O protocolo dos testes de ELISA foi o mesmo adotado para o item 3.5.1..

3.5.4. Comparação entre o ELISA sanduíche e o teste de toxicidade em camundongos

O conteúdo intestinal foi contaminado artificialmente com toxina beta não purificada na diluição de 25DMM/mL e foi feita diluição seriada, com fator de diluição 2, até 0,003 DMM/mL.

Todas as diluições foram submetidas à análise pelo ELISA sanduíche. Para o teste de toxicidade em camundongos utilizou-se diluições que continham de 25 DMM/mL até 0,003 DMM/mL. Inoculou-se dois camundongos por via endovenosa com 0,2 mL de cada diluição e estes foram observados por 72 horas.

Os testes ELISA sanduíche foram realizados em paralelo com o teste de toxicidade em camundongos, a mesma amostra de conteúdo intestinal, artificialmente contaminada, era inoculada em camundongos imediatamente após ser utilizada no ELISA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da pureza da amostra

As colônias características de *Clostridium perfringens*, umbilicadas, lisas acinzentadas com halo de dupla hemólise e negras no SFP foram avaliadas pelo método de Gram e apresentaram somente bastonetes Gram positivos, sem a presença de qualquer contaminante.

4.2. Titulação da toxina beta produzida e da toxina beta recebida do Vallée S.A.

A toxina beta produzida e concentrada 10 vezes, apresentou título de 3.840 DMM/mL, a toxina "Vallée", concentrada 20 vezes, apresentou título de 41.848,2 DMM/mL. A grande diferença de títulos entre as toxinas pode ser explicada pelas condições em que elas foram produzidas, já que como descrito por Pivnick et al. (1963) e Jorge (2003) o controle do pH influencia diretamente na quantidade de toxina produzida e na manutenção de sua atividade por um período mais longo de tempo. A toxina recebida além de ter sido duas vezes mais concentrada foi produzida em fermentador com controle automático de pH e sob fluxo contínuo de nitrogênio que, promove a remoção dos produtos voláteis do metabolismo anaeróbio que podem interferir no crescimento bacteriano e conseqüentemente afetar a quantidade de toxina produzida, Mozzer (2004). Neste experimento a toxina foi produzida em jarra de anaerobiose, com frasco estático e sem controle do pH que ao final de vários ensaios havia caído de 7,8 para até 5,7.

4.2.1. Teste de toxicidade e avaliação da toxina produzida

A leitura do teste de toxicidade teve como resultado a morte dos animais inoculados com a toxina beta sem adição de tripsina, e o teste de soroneutralização teve como resultado a sobrevivência somente dos

animais inoculados com a mistura de toxina beta mais antitoxina beta, o que de acordo com Batty e Glenny (1947), caracteriza a toxina produzida como sendo o tipo beta. A sobrevivência dos animais inoculados com a toxina beta tripsinizada confirma a sensibilidade desta toxina frente a agentes proteolíticos como a tripsina, provocando

perda de sua toxicidade, como descrito por Sakurai e Duncan (1987).

4.2.2. Dosagem de proteína

Os resultados dos níveis de proteína de quatro partidas de toxina beta purificadas expressos em miligramas são mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados das quantidades de toxina beta purificadas pela coluna de afinidade metálica em dias diferentes.

Métodos utilizados para dosagem protéica	Dosagem 1 (mg)	Dosagem 2 (mg)	Dosagem 3 (mg)	Dosagem 4 (mg)	Σ (mg)
Método do coeficiente de extinção	1,36	1,88	1,42	3,97	8,63
Método de Layne	1,51	1,49	1,41	3,93	8,34

Como pode ser visto na tabela 2 não houve grande diferença nas quantidades de toxina beta purificada quando comparados os métodos de Layne (1953) e o método do coeficiente de extinção de Worthington et al. (1973), assim optou-se por realizar as dosagens protéicas das demais purificações através do método do coeficiente de extinção que se mostrou mais rápido pois a leitura é feita apenas em comprimento de onda de 280nm reduzindo assim a manipulação da toxina purificada. O coeficiente de extinção se mostrou confiável

e repetitivo quando utilizado para dosagem protéica da toxina epsilon purificada, conforme também verificado por Parreiras (2001).

4.2.3. Purificação da toxina beta:

Antes do início da purificação da toxina beta, esta foi submetida à eletroforese para confirmação da presença da banda referente ao seu peso molecular que é de aproximadamente 36,65 kDa. (Fig. 1)

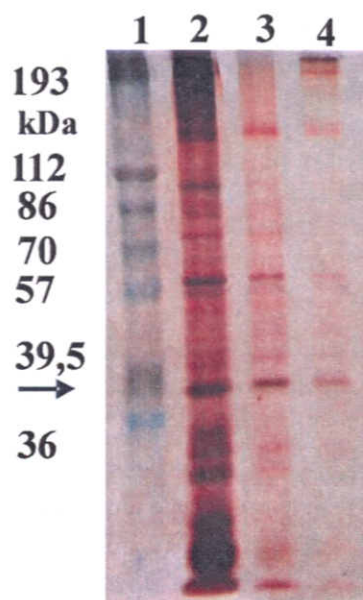


Figura 1: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela Prata para visualização da banda referente ao peso molecular da toxina beta. (1) Padrão pré-corado de alto peso molecular, (2) Toxina bruta, (3) Toxina diluída 1:10, (4) Toxina diluída 1:50.

Com a confirmação da presença da toxina beta através da visualização da banda referente ao seu peso molecular iniciou-se o processo de purificação. Nas primeiras tentativas de purificação utilizando o método

descrito por Sakurai e Fujii (1987), o processo de purificação não apresentou resultados satisfatórios como está demonstrado na figura 2.

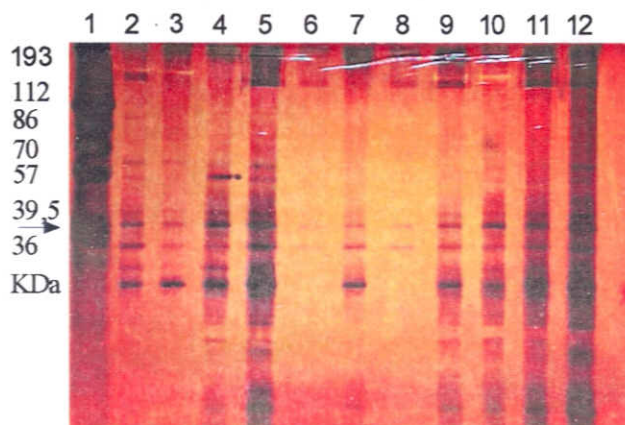


Figura 2: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela Prata das frações coletadas de diferentes tubos nas primeiras tentativas de se purificar a toxina beta produzida e concentrada através do método da cromatografia por afinidade metálica.

A figura 2 mostra a presença de bandas de peso molecular diferentes, semelhantes àquelas visualizadas na figura 1, o que

sugere não ter havido separação da toxina beta das demais proteínas presentes no meio. Isso provavelmente ocorreu por ter havido

saturação da coluna de afinidade metálica e não haver zinco suficiente para reter a toxina e possibilitar, após a eluição, a visualização da toxina beta pura, através da presença de uma banda única com peso molecular próximo de 38 kDa como a obtida por Sakurai e Fujii (1987).

Na tentativa de melhorar o desempenho da coluna de afinidade metálica na purificação da beta toxina adotou-se como norma limpar e recarregar a coluna com zinco ao final de cada purificação. O resultado obtido pode ser visto na figura 3.

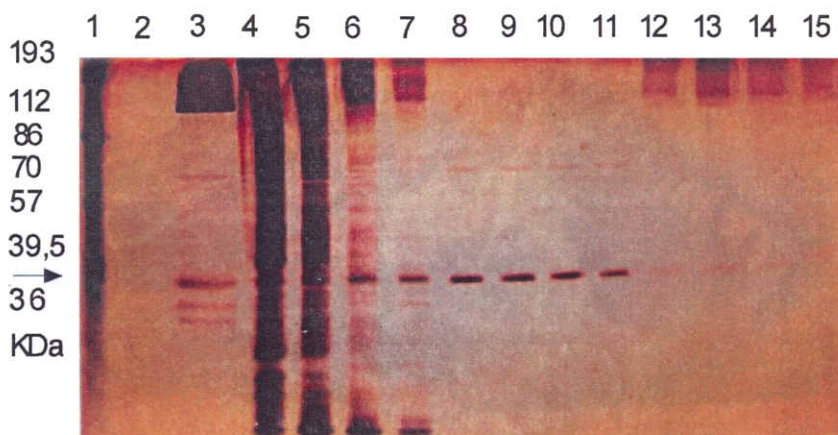


Figura 3: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pela Prata de toxina beta purificada por coluna de afinidade metálica. (1) padrão pré-corado de alto peso molecular, (3) Toxina beta padrão, (4, 5, 6 e 7) amostras coletadas dos primeiros tubos após a passagem de um volume de coluna, (8, 9, 10 e 11) amostras coletadas após a troca para o tampão de eluição, (12, 13, 14, 15) amostras coletadas após passagem de dois volumes de coluna do tampão de eluição.

Como observado na figura 3, a mudança no protocolo resultou resultado da purificação por coluna de afinidade metálica, pois após a troca do tampão de corrida para o de eluição, a toxina eluída apresentou-se pura, confirmado pela visualização de banda única com peso molecular aproximado de 36,65 kDa, como o descrito por Sakurai e Fujii (1987).

Embora o processo de purificação pelo método da afinidade metálica tenha apresentado resultados satisfatórios evidenciado pela visualização de bandas únicas com peso molecular de

aproximadamente 36,65 kDa (figura 3), o processo mostrou ser lento e o rendimento obtido muito baixo, aplicava-se 15,0 mg de proteína total e recuperava-se em média 1,5mg. Esse processo gasta em torno de 10 horas para a purificação de aproximadamente 1,5mg de toxina beta, e mais 10 horas para preparar a coluna para novo processo, ou seja, para cada purificação gastam-se dois dias.

Assim fez-se necessário buscar um método de purificação mais rápido. Avaliou-se a purificação pelo método da imunoafinidade e os resultados são mostrados na figura 4.

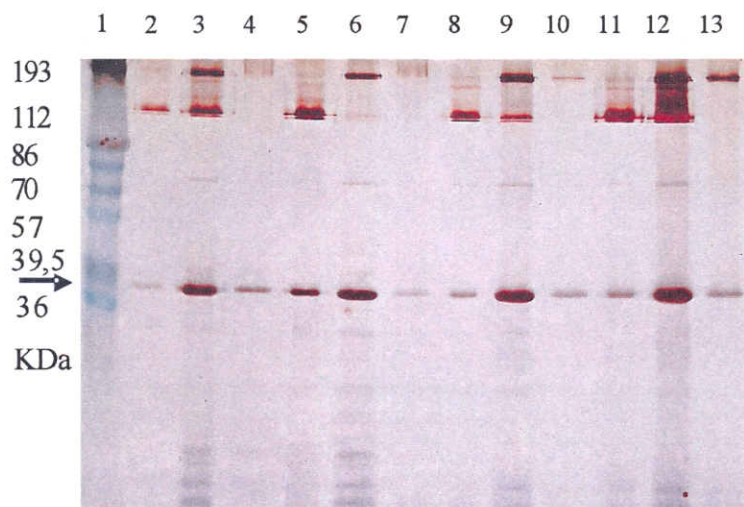


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela Prata das frações coletadas após a troca para o tampão de eluição na cromatografia de imunoafinidade. A figura evidencia a presença de uma banda de peso molecular de aproximadamente 36,453kDa da toxina beta, forma monomérica, e bandas de pesos moleculares superiores referentes às formas oligoméricas da toxina beta. (1) Padrão de alto peso molecular. (2 e 3) frações 4 e 5 cromatografia 1. (4, 5 e 6) frações 3,4 e 5 cromatografia 2. (7, 8 e 9) frações 3, 4 e 5 cromatografia 3. (10, 11 e 12) frações 3, 4 e 5 cromatografia 4. (13) fração 3 cromatografia 5.

Como pode ser visto na figura 4 o processo de purificação pelo método da imunoafinidade foi eficiente, o aparecimento de bandas com peso molecular superior aos 36,65 kDa da toxina beta, isso pode ser explicado pois essa pode ser encontrada, no MPT, sob duas formas. Uma forma monomérica, ativa, de peso molecular próximo dos 36,65 kDa e outra forma oligomérica, inativa, de peso molecular superior ao da forma monomérica. As formas oligoméricas da toxina beta, embora inativas, ainda possuem atividade imunogênica como descrito por Sakurai et al. (1997) e Hunter et al. (1993), o que explica seu reconhecimento, pelos

anticorpos fixados a coluna de imunoafinidade.

Para confirmar a presença da toxina beta na forma oligomérica foi realizado um "Western blot" no qual o conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta reconheceu as bandas de pesos moleculares superiores aos 36,65 kDa da forma monomérica da toxina beta (Fig. 5).

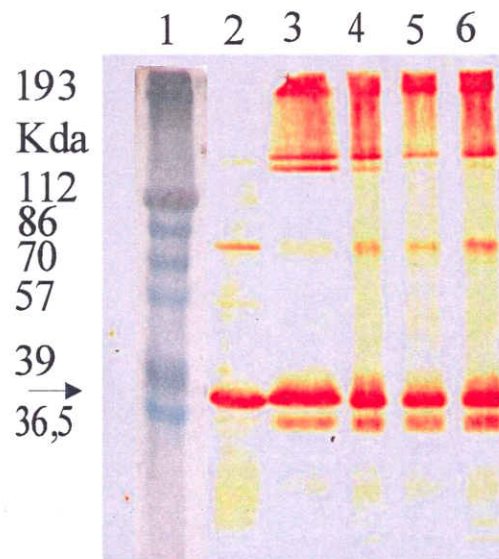


Figura 5: "Western blot" mostrando a presença da toxina beta nas formas oligoméricas, peso molecular superior aos 38 Kda da forma monomérica, reconhecida pelo conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta. (1) Padrão de peso molecular pré-corado; (2) 1,0µg de toxina beta purificada e iodada em PBS 0,1 M; (3-6) 2,5µg de toxina beta purificada e iodada em PBS 0,1 M.

A banda de peso molecular visualizada logo abaixo da banda referente ao peso da toxina beta na sua forma monomérica (36,65 kDa), é indicativo de que houve degradação da toxina beta antes do processo de iodação, o mesmo foi relatado para a toxina epsilon por Parreiras (2001).

A purificação pelo método da imunoafinidade mostrou-se mais rápida e o rendimento foi 680,4% maior que o método de purificação por afinidade metálica. Em um único dia foi possível purificar 10,206mg de toxina beta, em nove cromatografias levando-se em consideração os dois dias gastos para purificar aproximadamente 1,5mg de toxina beta pelo método da afinidade metálica.

4.2.4. Teste de toxicidade da toxina beta purificada

A menor quantidade de toxina beta purificada que matou 100% dos animais inoculados foi 0,5µg/mL, e embora a titulação não tenha sido feita em DL₅₀ o resultado está dentro da faixa de valores obtidos por diferentes autores que vão desde 4,0µg/mL (McDonel, 1980) a 0,310µg/mL (Sakurai e Fujji, 1987).

4.3. Avaliação dos soros hiperimunes

A avaliação dos soros hiperimunes dos carneiros imunizados com o toxóide beta é apresentada na figura 6.

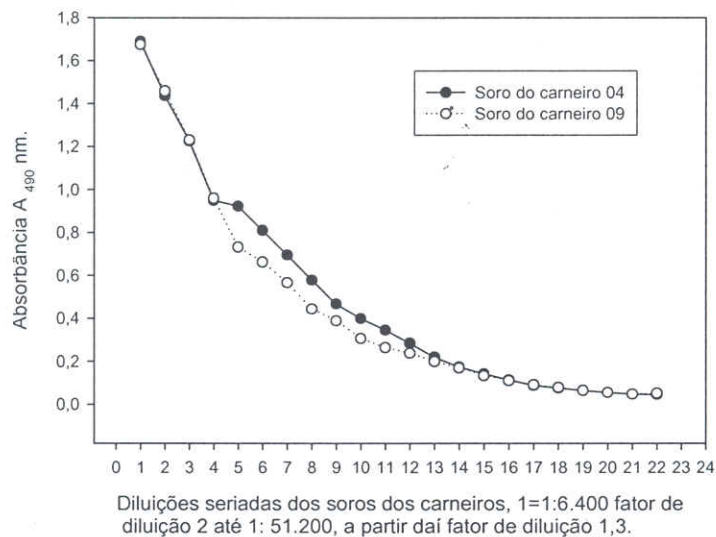


Figura 6: Avaliação por ELISA indireto dos soros hiperimunes produzidos em carneiros. As placas foram sensibilizadas com 1,0µg/mL de toxina beta purificada e iodada.

Os soros dos carneiros imunizados com o toxóide beta, no ponto 11 (Fig.6) que equivale a diluição 1: 321.272 ainda apresentavam leitura de 0,3 o que demonstra a presença de grande quantidade de imunoglobulina de carneiro antitoxina beta nos soros, pois a leitura é real, já que a média dos valores do controle negativo foram subtraídos de todas as médias do valores para cada diluição antes da montagem do gráfico.

A iodação controlada mostrou ser um eficiente método para a preparação de toxóides, pois os resultados obtidos para a

toxina beta neste experimento estão de acordo com os resultados obtidos para a toxina epsilon por Parreiras (2001). O alto título de anticorpos mostra eficiência do protocolo de imunização adotado.

4.3.1. Purificação, avaliação e conjugação das imunoglobulinas de carneiro

O processo de purificação das imunoglobulinas de carneiro foi acompanhado por leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 280nm e o resultado apresentado na figura 7.

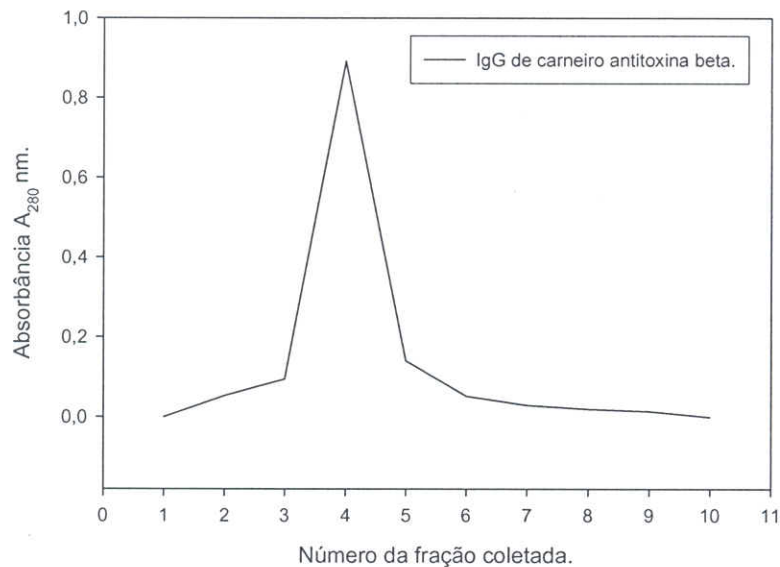


Figura 7: Gráfico ilustrando a purificação da IgG de carneiro antitoxina beta com a utilização da coluna de imunoafinidade, frações de 2,0 mL coletadas após a troca para o tampão de eluição.

O acompanhamento do processo de purificação das imunoglobulinas de carneiro por leituras espectrofotométricas permitiu avaliar a capacidade da coluna a fim de se padronizar um volume de soro a ser aplicado otimizando assim o seu uso.

Para a purificação das imunoglobulinas padronizou-se a passagem de 1,5 mL de soro hiperimune o que gerou um rendimento médio de 1,2mg de IgG de carneiro para cada cromatografia. Para uma hiperimunização eficiente espera-se que 10% do volume de soro obtido seja representado por imunoglobulinas

específicas. Os resultados mostraram valores bem próximos, comprovando a eficiência do protocolo de imunização adotado.

Após a purificação por imunoafinidade, as imunoglobulinas de carneiro foram avaliadas pelo teste de ELISA indireto, que certificou que o processo de purificação não alterou a atividade imunológica.

Comprovada a manutenção da atividade imunológica parte das imunoglobulinas foi conjugadas à horseradish peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, USA). A titulação do conjugado produzido foi feita por ELISA indireto (Fig.8).

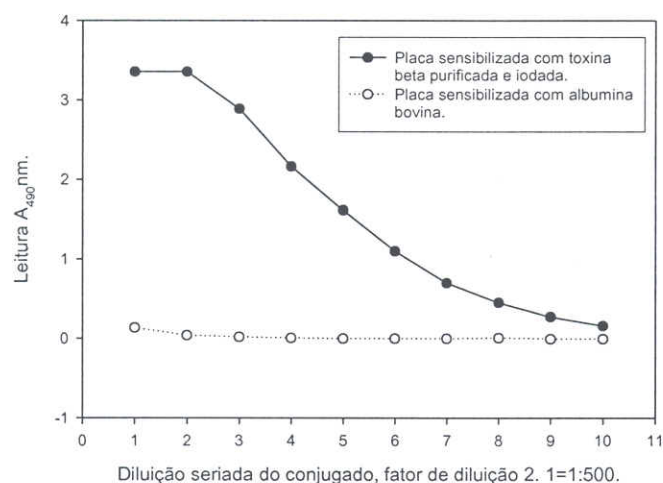


Figura 8: ELISA indireto mostrando a titulação do conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta. A placa foi sensibilizada com 1,0µg/mL de toxina beta purificada e iodada e 100µg/mL de albumina bovina.

A partir do resultado mostrado na figura 8 foram realizados outros ensaios com o conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta nas diluições 1:20.000, 1:25.000 e 1:30.000 que permitiram a padronização da diluição de uso do conjugado em 1:25.000. A figura 8 mostra ainda que o conjugado produzido não reage com a albumina bovina que é utilizada para preparo da solução de bloqueio do ELISA e que a partir deste resultado foi utilizada também para a

diluição do conjugado, para prevenir reações inespecíficas.

A especificidade do ELISA sanduíche para a detecção da toxina beta é comprovada pelo resultado apresentado na figura 9, pois não houve reconhecimento da toxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D e a toxina beta produzida pelos *Clostridium perfringens* tipos B e C foi reconhecida normalmente.

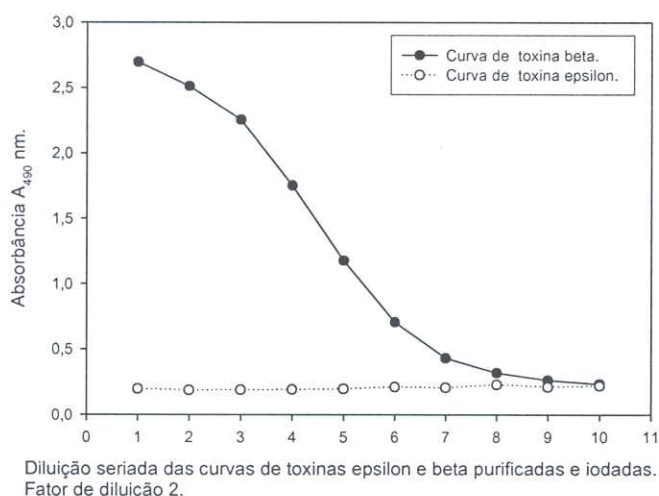


Figura 9. ELISA sanduíche mostrando a especificidade para a detecção da toxina beta frente à toxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D. As Placas foram sensibilizadas com 1,0µg/mL de IgG de carneiro antitoxina beta purificada, adicionou-se uma curva de toxina beta purificada e iodada na concentração inicial de 2,5µg/mL e uma curva de toxina epsilon purificada e iodada também na concentração inicial de 2,5µg/mL. Conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta foi utilizado na diluição de 1:25.000.

4.4. Amostras negativas de conteúdo intestinal

O resultado para o teste de toxicidade em camundongos foi negativo, todos os animais inoculados com os conteúdos intestinais

filtrado e não filtrado permaneceram vivos até o momento da leitura do teste.

Os conteúdos intestinais filtrado e não filtrado foram avaliados por ELISA direto e o resultado apresentado na figura 10.

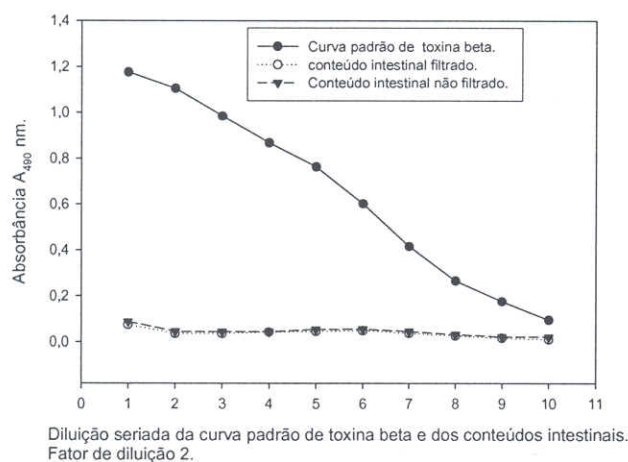


Figura 10: ELISA direto mostrando não haver interferência do conteúdo intestinal coletado com o teste proposto para a detecção da toxina beta. Placas sensibilizadas com 1,0µg/mL de IgG de carneiro antitoxina beta purificada. Foi adicionada uma curva padrão de toxina beta purificada e iodada na concentração inicial de 2,5µg/mL, e os conteúdos intestinais filtrado e não filtrado foram adicionados na diluição inicial 1:2. Conjugado de IgG de carneiro antitoxina beta foi utilizado na diluição de 1:25.000.

Como mostra a figura 10 não houve interferência dos conteúdos intestinais com o teste de ELISA sanduíche, a filtração não se faz necessária quando o conteúdo intestinal é processado da maneira proposta neste trabalho, isso é comprovado pelo resultado negativo do teste de toxicidade em camundongos e no resultado do ELISA direto que não mostraram diferença entre o conteúdo intestinal filtrado e o não filtrado. A filtração de pequeno volume de conteúdo intestinal consome um número muito grande

de unidades de filtros o que acabaria por encarecer a técnica.

4.5. Detecção de toxina beta pelo ELISA sanduíche

Para testar a sensibilidade do ELISA sanduíche em detectar a toxina beta, uma curva de toxina beta purificada e iodada foi adicionada à placa de ELISA, uma em conteúdo intestinal diluído 1:8 e outra em PBS 0,1M acrescido de 0,05% de tween 20, o resultado é apresentado na figura 11.

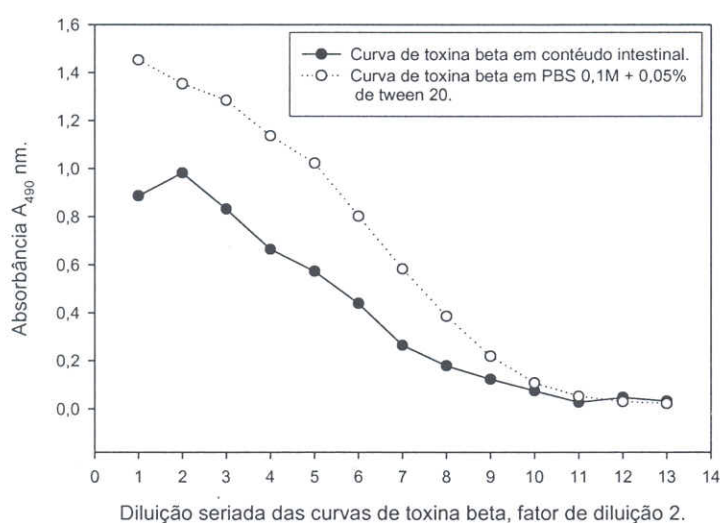


Figura 11. Detecção da toxina beta purificada e iodada pelo ELISA sanduíche em PBS 0,1 M + 0,05% de tween 20 e em conteúdo intestinal diluído 1:8. As curvas de toxina beta tiveram como concentrações iniciais 2,5µg/mL.

Como controle negativo substituiu-se a toxina beta por PBS 0,1 M acrescido de 0,05% de Tween 20 para a curva em PBS e conteúdo intestinal diluído 1:8 sem toxina para a curva em conteúdo intestinal. Antes da confecção do gráfico a média dos valores negativos para curva em PBS foi subtraída de cada média de cada ponto da curva em PBS e a média dos valores negativos para a curva em conteúdo intestinal também foi subtraída de cada média de cada ponto da curva em conteúdo intestinal. Assim, o resultado mostrado na figura 11 é real e o critério adotado para estabelecer o ponto de corte foi o primeiro valor antes da leitura

entrar no platô, representado na figura 11 pelo ponto 11 ou 2,44 ng/mL.

O ELISA sanduíche conseguiu detectar 2,44ng/mL de toxina beta purificada e iodada em PBS 0,1M acrescido de 0,05% de tween 20, o que caracteriza uma boa sensibilidade quando comparados com os valores de 8 ng/mL, descrito por El Hidrissi e Ward (1992a) e 1ng/mL, por Nagahama et al. (1991), quando comparada com a sensibilidade do ELISA sanduíche desenvolvido para a detecção da epsilon toxina ela ainda é baixa, pois Nagahama et al. (1991) relataram uma sensibilidade de

0,1ng/mL. A detecção de 2,44 ng/mL de toxina beta purificada e iodada em conteúdo intestinal é 12,29 vezes mais sensível que os 30ng/mL detectados por Nagahama et al. (1991).

4.5.1. Comparação do limite de detecção de toxina beta entre o ELISA sanduíche e o teste de toxicidade em camundongos

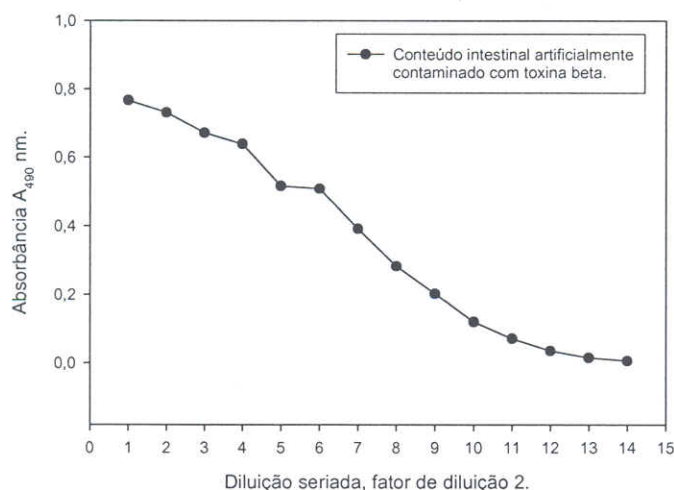


Figura 12. Titulação por ELISA sanduíche das diluições usadas no teste de toxicidade em camundongos, conteúdo intestinal contaminado artificialmente com toxina beta não purificada na concentração inicial de 25 DMM/mL em diluição seriada com fator de diluição 2 até 0,003 DMM/mL.

A sensibilidade do teste de toxicidade em camundongos, como esperado, se limitou a 10 DMM/mL de toxina beta não purificada. O ELISA sanduíche foi capaz de detectar 0,01 DMM/mL, o que significa dizer que o ELISA sanduíche foi 1000 vezes mais sensível que o teste de toxicidade em camundongos. Nagahama et al. (1991), afirmaram que a sensibilidade do ELISA pode ser de 10 a 1000 vezes maior que a sensibilidade do teste de toxicidade em camundongos. Uzal et al. (2003) relataram ter conseguido detectar 0,075DL₅₀/mL de toxina epsilon em conteúdo intestinal de ovinos, com a utilização de um ELISA com anticorpos policlonais semelhante ao desenvolvido neste trabalho, dado este que comprova a boa sensibilidade do ELISA sanduíche desenvolvido para a detecção de toxina beta em conteúdo intestinal.

Os bons resultados obtidos na padronização desta técnica de diagnóstico remetem ao seu aprimoramento para a utilização como opção futura aos bioensaios, contribuindo para a redução do número de animais utilizados. O ELISA sanduíche para o diagnóstico da enterotoxemia necessita ser testado frente a um número maior de amostras de conteúdos intestinais para que o seu desempenho seja avaliado com maior segurança, a fim de disponibilizá-lo para o uso no diagnóstico. A implementação de um teste como esse em um programa bem conduzido viria a contribuir significativamente para o entendimento da real situação da doença no país. Outra aplicação desse teste seria a avaliação da qualidade das vacinas que contém em sua formulação o toxóide beta. A utilização do ELISA para detecção de anticorpos vacinais foi proposta com sucesso por Parreiras (2001).

A quantificação da toxina produzida para utilização em pesquisa ou para a produção de vacinas também pode ser realizada através do ELISA, desde que o teste seja padronizado para esse fim.

5 CONCLUSÕES

A purificação da toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo C pelo método da imunoafinidade se mostrou eficiente, prática e rápida.

O ELISA sanduíche mostrou ser mais sensível para a detecção da toxina beta em conteúdo intestinal que o teste de toxicidade em camundongos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

BATTY, I., GLENNY, A.T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxins and antitoxins. *British journal of experimental Pathology*, v.27, p.110-126,1947.

BRITISH PHARMACOPEIA (VETERINARY). *Veterinary Vaccines*. Department of health and social security, Medicines Commission. Reino Unido. 1998

BRANE, K. Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Clostridium perfringens* β anti-toxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 24, p.293-297, 1999.

EL IDRISSEI, A. H., WARD, G.E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta e epsilon toxins. *Veterinary microbiology*, Amsterdam, v. 31, p. 89-99, 1992a.

EL IDRISSEI, A. H., WARD, G.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary microbiology*, Amsterdam, v. 31, p.389-396. 1992b.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 2 Ed. Saint Ruffine: Maisonneuve S. A. 1998. p.363: Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium.

HENEINE, I.F.; HENEINE, L. G. *Stepwise Iodination*. A General Procedure for Detoxification of Proteins Suitable for Vaccine Development and Antiserum Production (Review). *Biologicals*, v.26, p. 25-32. , (1998)

HUNTER, S. E.C., BROWN, E., 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*. *Infection and Immunity*, v.61,n. 9,p.3958-3965, 1993.

JORGE, E. V. Ampliação da produção de toxinas botulínicas tipos C e D para a fabricação de vacinas veterinárias. 2003. 53f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970).

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol*, n.3, p. 447-454, 1957.

LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e epsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil.

- Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. V.52, n. 4, p. 313-318, 2000.
- MACDONEL, J.L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). Journal of pharmacology, v. 10, p. 617-655, 1980.
- MOZZER, O. D. Cultivo em alta densidade do *Clostridium botulinum* tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias. 2004. 149f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- NAGAHAMA, M., KOBAYASHI, K., OCHI, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters*, Tokushima, v.84, p.41-44, 1991.
- NAKANE, P.K.; KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. The journal of Histochemistry and Citochemistry. V.22, p. 1084-109, 1974.
- NASCIMENTO, R.A.P. Avaliação da eficiência de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. 2003. 33f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG.
- NAYLOR, R. D., MARTIN, P. K., SHARPE, R. T. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Research in Veterinary Science*, Shrewsbury, v.42, p. 255-256, 1987.
- NILO, L. Bovine "enterotoxemia". Factors affecting the stability of the toxins of *Clostridium perfringens* types A, C and D. Canadian Veterinary journal, v.6, n. 2, p.38-42, 1965.
- NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal diseases. A review of current knowledge. Canadian Veterinary journal, v.21, p. 141-148, 1980.
- NILO, L. Toxigenic characteristics of *Clostridium perfringens* Type C in enterotoxemia of domestic animals. Journal Veterinary Research, n. 51, p.224-228, 1987.
- PARREIRAS, P. M. ELISA competitivo para detecção de imunoglobulina antiprototoxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D. 2001. 44f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG.
- PIVNICK, A.F.S.A.H., HABEEB, B., GORENSTEIN, P.F. et al. Effect of pH on toxinogenesis by *Clostridium perfringens* type C. Canadian Journal of Microbiology, v. 10, p. 329-344, 1964.
- 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.
- SAKURAI, J., DUNCAN C. L. Some properties of beta toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. Infection and Immunity, v.21, n 2, p. 678-680, 1978.
- SAKURAI, J., FUJII, Y. Purification and Characterization of *Clostridium perfringens* Beta toxin. *Toxicon*, v.25, n.12, p. 1301-1310, 1987.
- SHATURSKY, O., BAYLES, R., ROGERS, M., et al. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation selective channels in lipid bilayers. Infection and Immunity, v. 68, n. 10, p. 5546-5551, 2000.
- SIGURDARSON, S., THORSTEINSSON, T. Sudden death of icelandic dairy cattle. *The Veterinary Record*, Iceland, p. 410, 1990.
- SILVEIRA, D., SOUZA, A.M.; MESQUITA, A.J. et al. Enterotoxemia em

bovinos uma enfermidade de importância emergente. *Bol. Tec. Inf. Rhodia-Mérieux*, v.2, n.3, p.1-4, 1995.

SINCORTE, Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte, II.,2003. João Pessoa. Anais...João Pessoa: emepa-pb.2003. 511 p.

SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestical animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, n. 2, p. 216-234, 1996.

STERNE, M., WARRACK, G.H. The types of *Clostridium perfringens*. *Journal Pathology Bact. P.* 279-283, 1964.

UZAL, F. A., NIELSEN, K., KELLY, W. R. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, Canada, v.51, p.223-231, 1997.

UZAL, F. A., KELLY, W.R., THOMAS, R. et al. Comparison of four techniques for detection of *Clostridium perfringens* type D

epsilon toxin in intestinal contentes and other body fluids of shep and goats. *Journal Veterinary diagnosis investigation* , v. 15, p. 94-99, 2003.

WEDDEL, W., WORTHINGTON, R. W. An enzyme labeled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contentes. *New Zealand Veterinary Journal*, Auckland, v.33, p.36-37, 1984.

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. *Biologycals*, v.19, p.281-286, 1991.

WORTHINGTON, R. W., MULDER, M.S.G., VAN RNSBURG, J.J. *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin. Some chemical immunological and biological properties of a highly purified prototoxin. *Onderstepoort journal veterinary research*, v.40, n. 4, p. 143-152, 1973.