

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Roseane Brandão de Brito

**PRODUÇÃO E CERTIFICAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA
BIOLÓGICOS PARA USO VETERINÁRIO:
Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, suas toxinas e antitoxinas**

**Belo Horizonte
2019**

ROSEANE BRANDÃO DE BRITO

**PRODUÇÃO E CERTIFICAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA
BIOLÓGICOS PARA USO VETERINÁRIO:
Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, suas toxinas e antitoxinas**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em
Ciência Animal na Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2019**

B862p

Brito, Roseane Brandão de, 1976

Produção e certificação de materiais de referência biológicos para uso veterinário: Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, suas toxinas e antitoxinas / Roseane Brandão de Brito - 2019
190 p.: il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Coorientadores: Ângela Maria Quintão Lana

Antônio Augusto Fonseca Júnior

Tese de Doutorado apresentada na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Botulismo – vacinas - Teses. 2 – *Clostridium botulinum* - Teses. 3 – Estirpes –
I. Lobato, Francisco Carlos Faria - II. Lana, Ângela Maria Quintão– III. Júnior, Antônio Augusto
Fonseca – IV- Universidade Federal de Minas Gerais – V- Veterinária.

CDD – 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

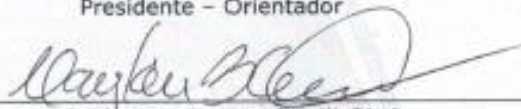
ROSEANE BRANDÃO DE BRITO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

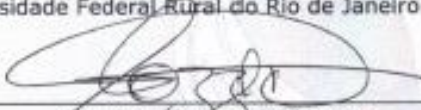
Aprovada em 20 de Março de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador



Prof. Clayton Bernardinelli Gitti
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ



Dr. Otto Domenico Mozzer
Ceva Sante Animale



Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Escola de Veterinária - UFMG



“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Dedico esse trabalho às minhas filhas, Raissa e Rafaela, como exemplo de coragem, atitude, fé e determinação na busca de um sonho.

Dedico também ao meu marido, Rodrigo, pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os anjos e Santos que me fortaleceram e iluminaram meus passos nesta caminhada.

Ao Rodrigo Ramos, meu companheiro incondicional, por todo amor, incentivo, colaboração e paciência durante esses anos. Se existe alguém com quem eu realmente tenho que dividir os méritos dessa conquista, com certeza, é com você, meu amor!

Às minhas amadas filhas Raíssa e Rafaela por entenderem os momentos de ausência, a dedicação ao trabalho e por recarregarem minhas energias com sorrisos e abraços.

Aos meus pais por todo investimento que fizeram em minha educação, me permitindo chegar até aqui.

Ao meu querido orientador Prof. Francisco Lobato primeiramente, por acreditar no projeto e confiar no meu potencial. Agradeço ainda por sua imensa generosidade em compartilhar tamanha experiência, por nortear a pesquisa com críticas sempre relevantes, por me permitir momentos de autonomia e por seu imenso coração de pai, sempre acolhedor.

Aos co-orientadores, Prof^ª. Ângela Maria Quintão Lana e Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior, pelos exemplos profissionais e por todas as discussões, correções e críticas que permitiram engrandecer o resultado final.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela oportunidade.

À Coordenação do LANAGRO-MG (agora, LFDA-MG), nas pessoas do Dr. Ricardo Nascimento e Dr. Pedro Mota, pelo apoio e confiança.

Aos colegas do LFDA-MG que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, pela colaboração, presteza e amizade.

A Anderson Dias, Gabriel Lopes e Alexandre Penna pela disponibilidade constante em tantos experimentos e por serem incansáveis nesta tarefa árdua, amenizada com momentos de alegria e descontração. Minha eterna gratidão!

A Maurício Carvalho, Marina Issa, Rodrigo Brito, Rodrigo Ramos e Moacir Dias Júnior por todo o apoio na produção das toxinas e antitoxinas botulínicas e pelas discussões sobre o conteúdo deste trabalho.

A Rogério Caldas, Jair Polo e todo pessoal de apoio do biotério pelo fornecimento e cuidados com os animais, permitindo cumprir o cronograma intenso de testes. Aos animais que foram utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

A todos os colegas do PMC e do LPM, por adiantarem incontáveis vezes o meu trabalho, preparando meios de cultura, soluções e materiais para os experimentos.

A Antônio Augusto, Matheus Laguardia, Tatiana Oliveira e Eduardo Lara pelo apoio nas extrações de DNA e análises de bioinformática.

A Andréa Garcia, Patrícia Ferreira, Viviane Sousa, Lindemberg Rossi e Raquel Duarte pelo apoio no estudo colaborativo.

Ao Fernando Cunha e Gabriel Barros pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos queridos colegas da UGQ (agora SGQ), Adriana Marques, Amanda Lopes, Marcela Campos, Natanael Lourenço e Wagner de Souza pela amizade, apoio e por sustentarem o setor, mantendo sempre a QUALIDADE! Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios, em especial, ao Rodrigo Silva, Ronnie Assis, Guilherme Guerra, Carlos Oliveira Júnior e Jordana Santana pelo apoio nos experimentos e discussões sobre botulismo.

Ao AQUACEN, em especial ao Prof. Henrique Figueiredo, Fernanda Dorella e Felipe Pereira pelo apoio na parte genômica, e a toda equipe por sempre me acolherem com carinho.

Às indústrias veterinárias, pelo fornecimento de estirpes e pela participação no estudo colaborativo, confiando na parceria com o LFDA-MG e nos benefícios deste trabalho.

Ao SINDAN, na pessoa do Dr. Luiz Monteiro, pelo apoio na organização e fomento do estudo colaborativo.

Ao Pesquisador PhD Cedric Woudstra, pela colaboração na caracterização genotípica das estirpes e por compartilhar sua vasta experiência no estudo dos Clostrídios.

Às ajudantes domésticas e aos professores que cuidaram das minhas filhas e da minha casa, me proporcionando tranquilidade e minimizando um pouco a “culpa de mãe”.

Aos meus familiares e amigos que tornaram os dias de cansaço mais leves e revigorantes.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e torceram por mim.

SUMÁRIO

RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO GERAL	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1 <i>Clostridium botulinum</i>	29
3.2 As neurotoxinas botulínicas (BoNT).....	30
3.2.1 Estrutura das BoNTs	31
3.2.2 Mecanismo de ação das BoNTs	32
3.3 Características genômicas	34
3.3.1 O <i>locus</i> da toxina botulínica.....	34
3.3.2 Localização genômica do <i>locus</i> da neurotoxina botulínica.....	36
3.3.3 Evolução do gene das toxinas clostridiais.....	38
3.3.4 Comparações genômicas	40
3.3.5 <i>Clostridium botulinum</i> do Grupo III	42
3.3.6 Análises por PCR	46
3.3.7 Análises por sequenciamentos de nova geração.....	47
3.3.8 A genoespécie <i>Clostridium novyi sensu lato</i>	49
3.4 O botulismo	51
3.4.1 Diagnóstico.....	52
3.4.2 Métodos de determinação de toxina botulínica	52
3.5 Uso de anticorpos (antitoxinas).....	54
3.5.1 Uso no diagnóstico e identificação do tipo de toxina.....	55
3.6 Profilaxia do botulismo em bovinos.....	56
3.6.1 Controle oficial de vacinas contra o botulismo	58
3.7 Materiais de referência	59
3.7.1 Materiais de referência microbiológicos	61
3.7.2 Padrões biológicos.....	63
3.7.3 Produção de Materiais de Referência	64
4. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> tipos C e D.....	70
4.1. Introdução	70

4.2.	Material e métodos	70
4.2.1	Local de realização do experimento	70
4.2.2	Amostras: Estirpes bacterianas.....	70
4.2.3	Reconstituição e teste de pureza das amostras	71
4.2.4	Tipificação e confirmação da identidade das estirpes	71
4.2.5	Sequenciamento genômico de estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	74
4.2.6	Comparações genômicas das estirpes.....	76
4.3.	Resultados e discussão	76
4.3.1	Identificação fenotípica das estirpes.....	76
4.3.2	Identificação genotípica das estirpes por PCR.....	77
4.3.3	Sequenciamento genômico.....	81
4.3.4	Comparações	84
4.3.5	Impactos na produção de vacinas anti-botulínicas de uso veterinário no Brasil	85
4.4.	Conclusão	87
4.5.	Perspectivas futuras.....	87
5.	CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE TOXINAS E ANTITOXINAS BOTULÍNICAS	88
5.1.	Introdução	88
5.2.	Material e métodos	88
5.2.1	Local de realização do experimento.....	88
5.2.2	Estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	88
5.2.3	Animais utilizados.....	89
5.2.4	Padrões de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D utilizadas nos testes	89
5.2.5	Produção das toxinas	89
5.2.6	Avaliação e titulação das toxinas botulínicas	91
5.2.7	Produção das antitoxinas.....	93
5.3.	Resultados e discussão	97
5.3.1	Produção das toxinas	97
5.3.2	Produção das antitoxinas.....	105
5.4	Conclusão.....	107
6.	CAPÍTULO 3: CERTIFICAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA: ESTIRPES <i>Clostridium botulinum</i> , TOXINAS E ANTITOXINAS BOTULÍNICAS TIPOS C e D.....	108
6.1.	Introdução	108
6.2.	Material e métodos	108
6.2.1	Local de realização do experimento.....	108
6.2.2	Certificação de materiais de referência de estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	108

6.2.3	Certificação de materiais de referência de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D	110
6.3.	Resultados e discussão	115
6.3.1	Certificação de estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D	115
6.3.2	Certificação das toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D	116
6.3.3	Instruções de uso e rotulagem	133
6.4	Conclusão	133
6.5	Perspectivas futuras	134
7.	CONCLUSÃO	135
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
9.	ANEXOS	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de partidas de vacinas anti-botulínicas analisadas por ano pelo MAPA e o percentual de vacinas reprovadas nos testes de potência	59
Tabela 2 – Códigos e procedências das estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D utilizadas nesse trabalho	71
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados para identificação dos genes codificadores das toxinas botulínicas tipos C e D, tamanho do produto amplificado (pb) e referência utilizada	72
Tabela 4 - Ciclo de temperaturas para a PCR duplex convencional de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	72
Tabela 5 - Relação dos <i>primers</i> e sondas utilizados na PCR em tempo real para o gene <i>bont</i> em amostras de DNA de estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D, C/D e D/C	73
Tabela 6 - Relação dos <i>primers</i> e sondas utilizados na PCR em tempo real para a investigação de elementos genéticos móveis em estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C, D, C/D e D/C..	74
Tabela 7 – Estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> submetidas ao sequenciamento genômico, indicando local e tecnologia utilizada.	75
Tabela 8 - Sequências de <i>Clostridium botulinum</i> coletadas no GenBank, com suas respectivas denominações e números de acesso no NCBI, utilizadas como referência para comparações e na construção da árvore filogenética.....	76
Tabela 9 - Resultados comparativos da tipificação realizada por PCR duplex convencional ¹ e por PCR em tempo real ⁴ das estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D	79
Tabela 10 - Perfil da presença (+) ou ausência (-) dos marcadores genéticos investigados nas estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D, PCR em tempo real*	81
Tabela 11 – Origem e informações sobre sequências genômicas <i>draft</i> de estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D/C brasileiras sequenciadas	82
Tabela 12 - Resultados de titulação de toxinas botulínicas tipos C e D, após diferentes etapas de produção e purificação, publicados por diversos pesquisadores.....	101
Tabela 13 - Testes de neutralização da toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), produzida a partir da estirpe CBC 02, com padrões de referência de antitoxinas botulínicas tipo C fornecidas pelo MAPA (Lote 01/1995) e pelo NIBSC (01/508), utilizando bioensaio em camundongos .	102
Tabela 14 – Testes de neutralização da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) produzida a partir da estirpe CBD 09 com padrão de referência de antitoxina botulínica tipo C NIBSC (01/508), utilizando bioensaio em camundongos.....	103
Tabela 15 - Testes de neutralização da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), produzida a partir da estirpe CBD 09 com padrões de referência de antitoxinas botulínicas tipo D fornecidas pelo MAPA (Lote 01/2010) e pelo NIBSC (61/001), utilizando bioensaio em camundongos .	104
Tabela 16 – Resultados dos testes de pureza, crescimento, PCR duplex convencional, PCR em tempo real e capacidade de produção de toxina realizados para a estirpe CBD 09 no período de avaliação do estudo de estabilidade, e a relação entre os resultados satisfatórios obtidos e o total de testes realizados.....	116
Tabela 17 – Resultados dos testes de pureza, crescimento, PCR duplex convencional, PCR em tempo real e capacidade de produção de toxina realizados para a estirpe CBC 02 no período de	

avaliação do estudo de estabilidade, e a relação entre os resultados satisfatórios obtidos e o total de testes realizados.....	116
Tabela 18 – Cálculo do desvio padrão de repetibilidade do método e comparação com a incerteza padrão alvo, para os toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D.....	119
Tabela 19 - Parâmetros estatísticos de inclinação (β_I), incerteza-padrão da inclinação (sb_I) e limite discriminante (L), calculados a partir das curvas obtidas nos estudos de homogeneidade dos produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), interpretação do teste estatístico a respeito da homogeneidade do produto e parecer final sobre sua aceitação.....	121
Tabela 20 – Cálculo do desvio desvio-padrão de homogeneidade (s_{bb}) utilizando modelo alternativo.....	122
Tabela 21 - Parâmetros estatísticos de inclinação (β_I), incerteza-padrão da inclinação (sb_I) e limite discriminante (L), calculados a partir das curvas obtidas nos estudos de estabilidade a curto e longo prazos, nas temperaturas de 25°C, 5°C, -20°C e -80°C, para os produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), interpretação do teste estatístico a respeito da estabilidade do produto e parecer final sobre sua aceitação.....	127
Tabela 22 – Resultados de título (em UI) obtidos para a antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios	128
Tabela 23 – Resultados de título (em L+) obtidos para a toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios	129
Tabela 24 – Resultados de título (em UI) obtidos para a antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios	129
Tabela 25 – Previsão de tempos de validade para os produtos: antitoxina botulínica tipo C, toxina botulínica tipo D e antitoxina botulínica tipo D, utilizando modelo de previsão de limites superior e inferior com tendência linear.....	130
Tabela 26 – Data de produção e validades teórica e rotulada para a antitoxina botulínica tipo C, toxina botulínica tipo D e antitoxina botulínica tipo D	130
Tabela 27 - Estimativa do valor de propriedade (título) da antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida.....	131
Tabela 28 - Estimativa do valor de propriedade (título) da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida.....	132
Tabela 29 - Estimativa do valor de propriedade (título) da antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida.....	132

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Características dos seis grupos de clostrídios filogeneticamente distintos, produtores de neurotoxinas botulínicas..... 30
- Quadro 2** – Proteínas da vesícula sináptica que agem como receptores para BoNT 33
- Quadro 3** – Tipos e subtipos de neurotoxinas botulínicas produzidas pelos seis diferentes grupos de *Clostridium* produtores dessas toxinas. 35
- Quadro 4** – Informações sobre classificação, origem, tipificação, sequenciamento genômico e os números de acesso no GenBank das estirpes de clostrídios produtores de BoNT sequenciadas por Smith *et al.* (2015) 43
- Quadro 5** – Matriz para tomada de decisão a respeito da uniformidade do material, considerando o sinal (positivo ou negativo) dos valores da inclinação (β_i) da curva obtida com os resultados do estudo de homogeneidade, e do limite discriminante calculado..... 112
- Quadro 6** – Matriz para tomada de decisão a respeito da estabilidade ou instabilidade do material, considerando o sinal (positivo ou negativo) dos valores da inclinação (b_i) da curva obtida com os resultados do estudo de estabilidade, e do limite discriminante calculado 112

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Formação do complexo de toxina e seu processo de associação / dissociação 32
- Figura 2** - Alvos enzimáticos e locais de clivagem de várias neurotoxinas botulínicas..... 33
- Figura 3** - Organização esquemática dos domínios da BoNT/C, BoNT/D e seus mosaicos (CD e DC). Cadeia leve (LC), cadeia pesada (HC), domínio de translocação N-terminal (HN), domínio de ligação ao receptor C-terminal (HC). Domínios altamente homólogos são indicados em cores semelhantes 34
- Figura 4** - Os *clusters* gênicos da BoNT com o código para as proteínas (*ha* e *ntnh*) que a envolvem e protegem, observados em estirpes toxigênicas 34
- Figura 5** - Dendrograma filogenético de espécies de *Clostridium* baseado na seqüência de genes 16S rRNA (Hill *et al.*, 2007). Uma árvore com 90 seqüências representativas é mostrada e ilustra a diversidade genética dentro dos clostrídios. *Clostridium botulinum* dos Grupos I, II, III e IV estão intercalados entre 27 outras espécies clostridiais nesta árvore. A árvore foi construída usando um alinhamento de seqüências 16S rRNA, que tinha 1.329 bases de comprimento após a remoção de colunas contendo mais de 80% de lacunas. A barra de escala indica a distância equivalente a 0,1 mutações por local (por exemplo, o gene 16S rRNA da estirpe F188 do grupo *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani* são 91,7% idênticos) 41
- Figura 6** - Representação esquemática de BoNTs tipos C e D. As homologias das seqüências de aminoácidos para a cadeia leve (L), cadeia pesada N-terminal (H_N) e C-terminal (H_C) são mostradas entre as barras. As regiões que mostram mais de 70% de homologia são indicadas com o mesmo padrão 45
- Figura 7** - Representação de domínios homólogos e não homólogos no gene da BoNT em *Clostridium botulinum* tipos C, C/D, D e D/C, e posição dos oligonucleotídeos utilizadas na PCR em tempo real descrita por Woudstra *et al.* (2012)..... 47
- Figura 8** - Genes toxigênicos no plasmidoma da estirpe BKT015925 (tipo C/D), em comparação com a localização do gene (cromossomo (chr), plasmídeo ou fago), em diferentes grupos de *Clostridium botulinum* e em outras espécies de *Clostridium*. 48
- Figura 9** - Relações filogenéticas de *Clostridium novyi* tipos A, B e C e *Clostridium haemolyticum* com outros clostrídios baseados em seqüências de 16S rDNA 50
- Figura 10** - Fluxo do processo de produção e certificação de um MRC microbiológico..... 63
- Figura 11** - Fotos de placas com crescimento típico de *Clostridium botulinum* tipos C e D em ágar gema de ovo (A e B) e ágar sangue de carneiro a 5% (C e D)..... 77
- Figura 12** - Foto da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, da PCR duplex convencional com identificação dos genes de *Clostridium botulinum* tipos C e D..... 78
- Figura 13** - Mapa de calor gerado pelo programa *Genees*, apresentando comparação dos genomas das estirpes 1274, 1275, 1276 e 1277 (seleção em azul) com genomas publicados de outras estirpes de Clostrídios..... 83
- Figura 14** - Complexo de proteínas das estirpes CBC 02 (tipo C) e CBD 09 (tipo D) com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT), proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*)..... 84

- Figura 15** – Árvore filogenética, incluindo estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C, D, C/D e D/C, construída no programa MEGA 6.06, utilizando o modelo de Neighbor Joining com 1000 réplicas de *bootstrap*, e modelo de substituição de aminoácidos DayHoff..... 85
- Figura 16** – Etapas da produção das toxinas botulínicas tipos C e D: reconstituição da estirpe liofilizada (A), crescimento em meios de cultura *Reinforced Clostridium Medium* (B), incubação em jarra de anaerobiose (C), crescimento em maior volume de meio de cultura RCM (D), transferência asséptica do pré-cultivo para o fermentador (E), fermentação em biorreator (Infors HD Labfors 3) com meio nutriente (F)..... 90
- Figura 17** – Ambiente de manutenção dos carneiros utilizados na produção das antitoxinas botulínicas tipos C e D (A) e momento de sangria por punção da veia jugular para obtenção dos anticorpos (B)..... 95
- Figura 18** – Etapas da produção das antitoxinas botulínicas tipos C e D: precipitação das imunoglobulinas com sulfato de amônio em banho de gelo (A), diálise (B) e liofilização em liofilizador de bancada (Christy, Alpha 1-4 LSCplus) (C) 96
- Figura 19** – Etapas do bioensaio em camundongo: preparação das diluições contendo toxina botulínica (tipo C ou D) e antitoxina homóloga (A), manutenção dos camundongos para o teste em caixa de aquecimento (B), inoculação da preparação na veia da cauda do camundongo (C), manutenção dos animais inoculados em caixas dentro de estantes ventiladas com controle de temperatura e pressão (D) 97
- Figura 20** - Eletroforese comparativa da Toxina botulínica tipo C lote 01/2016 e Toxina botulínica tipo D lote 01/2017 com os padrões oficiais do MAPA (Toxina botulínica tipo C lote 01/2011 e Toxina botulínica tipo D lote 03/2007), nas concentrações de 0,16 mg/mL (tipo C) e 0,14 mg/mL (tipo D) 99

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Resultados de título (em L+) obtidos no estudo de homogeneidade da toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos 120
- Gráfico 2** – Resultados de título (em UI) obtidos no estudo de homogeneidade da antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos 120
- Gráfico 3** – Resultados de título (em L+) obtidos no estudo de homogeneidade da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos 120
- Gráfico 4** – Resultados de título (em UI) obtidos no estudo de homogeneidade da antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos 121
- Gráfico 5** – Resultados de título (em L+) para a toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (34 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (210 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos..... 123
- Gráfico 6** – Resultados de título (em UI) para a antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (29 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (260 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos..... 124
- Gráfico 7** – Resultados de título (em L+) para a toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (27 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (365 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos..... 125
- Gráfico 8** – Resultados de título (em UI) para a antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (34 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (221 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos..... 126

LISTA DE ABREVIATURAS

6-FAM	<i>6-fluorescein amidite</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ANSES	<i>French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety</i>
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
AS	Ágar sangue de carneiro a 5%
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b_1	Inclinação
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
BoNT	Neurotoxina botulínica
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDT	Toxina binária de <i>Clostridium difficile</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMM	<i>Cooked Meat Medium</i>
COMAR	<i>International database for certified reference materials</i>
CP	Concentração protéica
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas).
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DL ₅₀	Dose letal média, dose necessária de uma substância para matar 50% de uma população em teste
DMM	Dose mínima mortal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECBS	<i>Expert Committee on Biological Standardization</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
EP	Ensaio de proficiência
<i>fliC</i>	Gene da flagelina
GBS	Sítio de ligação ao gangliosídeo
GenBank	<i>NIH genetic sequence database</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GU	Unidades genômicas
HA	Hemaglutinina
HC	Cadeia pesada
H _C	Terminal carboxílico da cadeia pesada
H _N	Terminal nitrogenado da cadeia pesada
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>

IS	Sequência de inserção
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
L	Limite discriminante
L+	Limite de morte
LC	Cadeia leve
LFDA-MG	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LTB	Subunidade B da enterotoxina lábil ao calor de <i>Escherichia coli</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinário
MQ	Média quadrática
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NAP	Proteínas associadas à neurotoxina
NCBI	<i>National Center for Biothechnology Information</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
NHLBI	<i>National Heart, Lung, and Blood Institute</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NTNH	Não-tóxica não-hemaglutinina
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGAAP	<i>Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline</i>
PI	Padrões Internacionais
PTX	Toxinas progenitoras
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR quantitativo
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
rH _c	Terminal carboxílico da cadeia pesada recombinante
ROX	6-carboxi-x-rodamina
rRNA	RNA ribossomal
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNARE	<i>Soluble NSF attachment receptor</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Syt	<i>Syntaxin</i>
TeNT	Toxina tetânica

UI	Unidade Internacional
VAMP	<i>Vesicle associated membrane protein</i>
VNTR	<i>Variable-number tandem repeat</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

O botulismo é uma doença grave, que acomete o homem e animais, causada pela ação de neurotoxinas botulínicas (BoNT) produzidas pelo *Clostridium botulinum*. Os tipos C, D e os mosaicos C/D e D/C são os principais causadores da doença nos animais. O botulismo em ruminantes no Brasil passou de uma doença endêmica nas décadas de 80-90, para ocorrência na forma de surtos esporádicos nos últimos anos, principalmente devido ao sucesso da implantação do programa de controle nacional baseado em vacinação sistemática do rebanho, além de práticas adequadas de manejo. Toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D são insumos essenciais utilizados na produção, controle de qualidade e teste oficial de vacinas contra o botulismo. Esses insumos também têm um importante uso no diagnóstico de casos suspeitos de botulismo, e na validação de novos métodos de diagnóstico, especialmente métodos alternativos ao bioensaio em camundongos. Igualmente importante e necessária é a caracterização de estirpes de *Clostridium botulinum*, que atualmente pode ser realizada por técnicas moleculares e genômicas, a fim de tipificá-las considerando os tipos mosaicos, sem equívocos advindos de reações cruzadas, possíveis de ocorrer no bioensaio. A exigência de dados mais exatos e confiáveis em áreas científicas e tecnológicas tem demandado materiais de referência de maior qualidade. Entretanto, um grande gargalo enfrentado é a dependência da importação desses materiais, ou mesmo a indisponibilidade no mercado. Acrescentam-se ainda restrições relativas ao bioterrorismo, que impedem a importação de toxinas botulínicas ou estirpes toxigênicas. Os objetivos deste trabalho consistiram em caracterizar e certificar lotes de estirpes de *Clostridium botulinum*, toxinas e antitoxinas botulínicas dos tipos C e D, como materiais de referência certificados (MRCs). Com a utilização de métodos microbiológicos clássicos, técnicas moleculares e sequenciamento genômico foi possível tipificar e caracterizar amostras de *Clostridium botulinum* tipos C, D e D/C mantidas atualmente pelo órgão oficial (MAPA) e por indústrias veterinárias, incluindo comparações genômicas com outras sequências disponíveis no GenBank. Lotes de estirpes de *Clostridium botulinum* tipo C (CBC 02) e tipo D (CBD 09), suficientemente homogêneas e estáveis foram produzidos e certificados como MRCs. Toxinas botulínicas e antitoxinas botulínicas tipos C e D produzidas neste trabalho foram consideradas homogêneas e estáveis, após testes estatísticos baseados em análise de regressão, com exceção da toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), que apresentou instabilidade. A caracterização foi realizada por meio de estudo colaborativo entre sete instituições brasileiras, incluindo fabricantes de vacinas e laboratórios de diagnóstico. Valores de referência foram estimados por modelo de medição com independência estatística, obtendo-se materiais com os seguintes títulos e incertezas: antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), (55 ± 13) UI; toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), (950 ± 153) L+; antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), (50 ± 13) UI. A temperatura recomendada para armazenamento dos produtos foi $\leq -20^{\circ}\text{C}$, e períodos de validade de 10 anos para as estirpes e de um ano para toxinas e antitoxinas, os quais poderão ser ampliados, após estudos complementares de monitoramento dos MRCs. O domínio das metodologias de produção e dos protocolos de certificação, atendendo a requisitos de normas de qualidade internacionalmente reconhecidas para a produção de MRCs, propiciaram a disponibilização de produtos de alta qualidade, indicados para uso em testes para identificação da bactéria, de controle de qualidade de vacinas contra o botulismo, validação de métodos, estabelecimento de rastreabilidade a outros materiais, monitoramento de laboratórios e ensaios de proficiência. Além disso, trouxe vantagem e independência científica ao país, agregando confiabilidade ao controle do botulismo, e minimizando dificuldades alfandegárias e custos envolvidos na obtenção desses insumos.

Palavras-chave: *Clostridium botulinum*, mosaico, botulismo, toxina botulínica, BoNT, antitoxina botulínica, material de referência certificado, MRC.

ABSTRACT

Botulism is a serious disease that affects humans and animals, caused by the action of botulinum neurotoxins (BoNT) produced by *Clostridium botulinum*. Types C, D and mosaics C /D and D/C are the main cause of disease in animals. Botulism in ruminants in Brazil changed from an endemic disease in the 1980s to 1990s, to sporadic outbreaks in recent years, mainly due to the successful implementation of the national control program based on systematic herd vaccination, as well as practices management. Botulinum toxins and botulinum toxins types C and D are essential inputs used in production, quality control and official testing of botulism vaccines. These inputs also have an important use in diagnosis of suspected cases of botulism, and in validation of new diagnostic methods, especially alternative methods to mouse bioassay. Equally important and necessary is the characterization of *Clostridium botulinum* strains, which can currently be performed by molecular and genomic techniques, in order to typify them considering the mosaic types, without any misunderstandings arising from cross reactions, which may occur in bioassay. The demand for more accurate and reliable data in scientific and technological areas has demanded higher quality reference materials. However, a major bottleneck is the dependence on imports of these materials, or even unavailability in the market. There are also added restrictions on bioterrorism, which prevent import of botulinum toxins or toxigenic strains. The objectives of this work were to characterize and certify batches of *Clostridium botulinum* strains, toxins and botulinum toxin types C and D, as certified reference materials (CRMs). With the use of classical microbiological methods, molecular techniques and genomic sequencing, it was possible to typify and characterize samples of *Clostridium botulinum* types C, D and D / C currently maintained by the official agency (MAPA) and veterinary industries, including genomic comparisons with other sequences available on GenBank. Batches of *Clostridium botulinum* strains type C (CBC 02) and type D (CBD 09), sufficiently homogeneous and stable were produced and certified as CRMs. Botulinum toxins and botulinum antitoxins types C and D produced in this work were considered homogeneous and stable after statistical tests based on regression analysis, except botulinum toxin type C (Batch 01/2016), which presented instability. The characterization was performed through a collaborative study between seven Brazilian institutions, including vaccine manufacturers and diagnostic laboratories. Reference values were estimated by measuring model with statistical independence, obtaining materials with the following titers and uncertainties: Botulinum toxin type C (Batch 01/2017), 55 ± 13 IU; Botulinum toxin type D (Batch 01/2017), 950 ± 153 L+; Botulinum antitoxin type D (Batch 01/2017), 50 ± 13 IU. Recommended temperature for storage of the products was $\leq -20^{\circ}\text{C}$, and periods of validity of 10 years for strains and of one year for toxins and antitoxins, which could be extended, after complementary studies of monitoring the CRMs. The domain of production methodologies and certification protocols, meeting the requirements of internationally recognized quality standards for production of CRMs, provided availability of high quality products, indicated for use in tests for bacterial identification, quality control of vaccines against botulism, validation of methods, establishment of traceability to other materials, monitoring of laboratories and proficiency tests. In addition, it brought scientific advantage and independence to the country, adding reliability to the botulism control, and minimizing customs difficulties and costs involved in obtaining these inputs.

Keywords: *Clostridium botulinum*, mosaic, botulism, botulinum toxin, BoNT, botulinum antitoxin, certified reference material, CRM.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Clostridium spp. são bactérias com forma de bastonetes, Gram-positivos, e anaeróbios estritos. Devido à alta capacidade de esporulação, forma de resistência desses anaeróbios no ambiente, os clostrídios são capazes de se manter potencialmente infectantes, mesmo em condições de aerobiose, por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana. Os processos infecciosos e intoxicações que afetam os animais domésticos causados por bactérias do gênero *Clostridium* são genericamente chamadas de clostridioses (Lobato *et al.*, 2013).

Clostrídios capazes de produzir neurotoxinas botulínicas (BoNTs) apresentam características bacteriológicas heterogêneas e estão divididos em várias espécies e grupos (Montecucco; Rasotto, 2015). Seis grupos de clostrídios filogeneticamente distintos produzem sete sorotipos distintos de neurotoxinas botulínicas (A-G). Dados recentes sugeriram um oitavo sorotipo, denominado BoNT/H (Dover *et al.*, 2014), mas comparações genéticas a caracterizaram como um mosaico A/F (Smith *et al.*, 2015).

Embora a maioria das espécies de *Clostridium botulinum* produzam apenas um sorotipo de toxina, alguns isolados produzem mais de um sorotipo. Cada sorotipo de toxina é categorizado em vários subtipos com base em suas sequências de aminoácidos. O número de subtipos tem crescido nos últimos anos, em virtude do aumento de sequenciamentos de genomas completos, da espectrometria de massas, e da disponibilidade de anticorpos monoclonais de alta afinidade (Rossetto *et al.*, 2014).

Codificadas pelo gene *bont*, essas toxinas são produzidas como cadeias polipeptídicas de 150 kDa, as quais são clivadas em uma cadeia pesada (*heavy chain* - HC), de 100 kDa, e uma cadeia leve (*light chain* - LC), de 50 kDa, que permanecem ligadas por meio de uma ligação dissulfeto. O mecanismo de ação das BoNTs consiste em três etapas: ligação, translocação e atividade enzimática. Na primeira etapa, as HCs se ligam às membranas de neurônios, principalmente colinérgicos, por meio de um sistema duplo-receptor, constituído por um gangliosídeo e um componente protéico. Em seguida, as BoNTs são translocadas para o citoplasma neuronal via endocitose. Acredita-se que, durante esta etapa, as HCs formem poros na membrana, pelos quais as LCs passam do meio extracelular para o intracelular neuronal. Finalmente, as LCs clivam uma ou mais proteínas SNARE (*soluble NSF attachment receptor*), responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Como resultado, ocorre redução da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que leva à inabilidade para contração muscular ou paralisia flácida dos músculos esqueléticos. Cada sorotipo cliva ligações peptídicas específicas de uma ou mais proteínas SNARE (Lobato *et al.*, 2013).

As BoNT são responsáveis no homem e nos animais por uma enfermidade conhecida como botulismo. Em condições naturais, o botulismo resulta da ingestão de toxina pré-formada nos alimentos contaminados (intoxicação) ou na multiplicação intestinal ou em feridas infectadas de linhagens produtoras de toxinas (toxinfecção). É uma doença grave caracterizada por paralisia flácida e alterações respiratórias importantes causadas pela ação das diferentes neurotoxinas produzidas, principalmente pelo *Clostridium botulinum* (Lindstrom; Korkeala, 2006).

As neurotoxinas botulínicas são de grande interesse econômico nacional, uma vez que os agentes produtores são responsáveis por elevados índices de perda nos rebanhos brasileiros. Nas décadas de 80 e 90 o botulismo em ruminantes ocorria de forma epidêmica, posteriormente de forma endêmica com registros de morbidade média e taxa de letalidade superiores a 31 e 94%, respectivamente; e atualmente ocorre principalmente na forma de surtos esporádicos (Silva *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 1998).

O diagnóstico laboratorial, importante para determinar o agente etiológico e para guiar as medidas preventivas e de controle para o problema, via de regra, envolvem a busca por toxinas clostridiais com utilização de anticorpos (antitoxinas). No entanto, a maior parte dos diagnósticos é baseada apenas em sinais clínicos e/ou ausência de lesões de necropsia, existindo poucos relatos de confirmação laboratorial.

De erradicação praticamente impossível, o controle e a profilaxia do botulismo são baseados principalmente na vacinação sistemática do rebanho com bacterinas e toxóides específicos, além de práticas adequadas de manejo (Lobato *et al.*, 2013).

O teste oficial de potência de vacinas contra clostridioses foi implementado no Brasil em 1997 conforme técnicas descritas na Portaria nº 49, 12 de Maio de 1997 (Brasil, 1997). Já o controle de vacinas contra o botulismo se baseou na técnica descrita e utilizada na África do Sul (Lobato *et al.*, 1998; Onderstepoort, [199?]). A técnica “padrão ouro” utilizada na realização do teste de potência de toxóides clostridiais e diagnóstico de grande parte das clostridioses é o bioensaio em camundongos. Apesar da reconhecida sensibilidade e confiança, este método é demorado (3-4 dias), em parte impreciso (obtenção de resultados extremos) e relativamente caro, por requerer grande número de animais (Wood, 1991).

Como resposta aos questionamentos bioéticos e à necessidade de eliminar ao uso de animais neste tipo de teste, métodos alternativos foram propostos, buscando resultados rápidos e confiáveis, com boa sensibilidade e especificidade aliados, quando possível, a um baixo custo (Pellett, 2013; Souza Júnior *et al.*, 2010; Lindstrom; Korkeala, 2006). Porém, um grande gargalo enfrentado por grupos de pesquisa, laboratórios para diagnóstico, indústrias produtoras de vacinas e o órgão oficial (MAPA) é a dependência da importação de materiais de referência, como toxinas e antitoxinas, ou mesmo a indisponibilidade destes no mercado, o que representa um empecilho para o bom andamento das pesquisas e implementação de testes alternativos.

Tanto no teste oficial, quanto na produção e controle de qualidade de vacinas contra o botulismo, as toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D são insumos essenciais e devem apresentar o mais elevado padrão de qualidade. Além disso, esses insumos têm um importante uso no diagnóstico de casos suspeitos de botulismo, e na validação de novos métodos de diagnóstico, especialmente métodos alternativos ao bioensaio.

Antitoxinas altamente específicas não estão facilmente disponíveis, e apenas algumas delas têm sido comercializadas. Além disso, atualmente não há nenhum material de referência certificado (MRC) de toxina botulínica disponível, que possa ser usado para comparar diferentes abordagens analíticas em laboratórios especializados. Acrescentam-se ainda problemas relacionados ao bioterrorismo, que impedem a importação de toxinas botulínicas ou estirpes toxigênicas de *Clostridium botulinum*.

A demanda por materiais de referência de maior qualidade está crescendo como consequência da exigência de dados mais precisos, exatos e consequentemente confiáveis em áreas científicas e tecnológicas. Alguns materiais de referência previamente aceitos podem não mais atender a esses requisitos mais rigorosos. Com isso, não é somente necessário que os produtores de material de referência forneçam informações sobre os seus materiais na forma de relatórios, certificados e declarações, mas também que demonstrem a sua competência na produção de materiais de referência com a qualidade apropriada (ABNT, 2017b). Normas e guias publicados pela International Organization for Standardization (ISO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estão disponíveis com diretrizes e requisitos que devem ser cumpridos pelos produtores de materiais de referência.

Tendo em vista a importância dos insumos no contexto nacional agropecuário, a caracterização de estirpes de *Clostridium botulinum*, e a produção de toxinas e antitoxinas botulínicas, como materiais de referência certificados, foram as atividades-chave desse trabalho. O domínio das metodologias de produção e dos protocolos para certificação destes insumos

trarão uma grande vantagem e independência científica ao país, propiciando a disponibilização de materiais de alta qualidade, que poderão ser utilizados na validação de novos métodos de controle *in vitro*, controle da qualidade, estabelecimento de valores de referência, avaliação da competência de equipes técnicas, monitoramento de laboratórios e uso em controles interlaboratoriais. Possibilitará ainda a implementação de um controle mais efetivo da enfermidade no país, amenizando as dificuldades alfandegárias e custos envolvidos na obtenção desses insumos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho consistiu em produzir e certificar materiais de referência relativos a: estirpes de *Clostridium botulinum*, toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D, conforme requisitos estabelecidos em normas internacionais, visando à utilização em análises de vacinas, diagnóstico de botulismo e validação de métodos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar estudos de caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D produtoras de toxinas;
- Produzir toxinas e antitoxinas botulínicas C e D como materiais de referência;
- Realizar estudos de homogeneidade destes insumos;
- Realizar estudos de estabilidade destes insumos;
- Realizar a caracterização destes insumos por meio de análises em diferentes laboratórios, visando à determinação dos valores de propriedade (título) e das incertezas de medição.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium spp. são bactérias com forma de bastonetes, Gram-positivos, esporulados e anaeróbios estritos. O principal fator de virulência dos clostrídios são as toxinas, responsáveis por várias doenças no homem e nos animais.

Um dos mais importantes aspectos da biologia dos clostrídios é a sua capacidade de formar endosporos. Os endosporos são altamente resistentes e permitem que sobrevivam a tratamentos drásticos como o aquecimento, podendo sobreviver em uma cultura pura, capaz de crescer e formar BoNT sem competição (Peck, 2009).

Entre o grande número de espécies de *Clostridium* (mais de 150), apenas 15 produzem toxinas protéicas potentes (Popoff; Bouvet, 2013). A BoNT é a toxina mais potente conhecida, sendo potencialmente fatal mesmo em baixíssimas quantidades (30-100 ng) (Peck, 2009).

Clostrídios capazes de produzir BoNTs apresentam características bacteriológicas heterogêneas e estão divididos em várias espécies e grupos. A posição taxonômica das espécies de *Clostridium botulinum* foram originalmente baseadas em apenas um fenótipo, a produção de BoNT, e estirpes variantes não-toxigênicas (embora geneticamente relacionadas a *Clostridium botulinum*) foram designadas como espécies diferentes como: *Clostridium sporogenes* e *Clostridium subterminale*. Mais tarde, diferenças fisiológicas entre as estirpes de *Clostridium botulinum* foram identificadas, mas observou-se que a produção de diferentes tipos de BoNT não necessariamente estava correlacionada com os fenótipos das estirpes de *Clostridium botulinum*.

Atualmente, seis grupos de clostrídios filogeneticamente distintos, produtores de sete diferentes sorotipos de neurotoxinas botulínicas (A-G) foram organizados e a seguinte classificação é adotada (Rossetto *et al.*, 2014):

- Grupo I: *Clostridium botulinum* proteolíticos, produtores de toxinas tipos A, B e F;
- Grupo II: *Clostridium botulinum* não-proteolíticos: produtores de toxinas tipos B, E e F;
- Grupo III: *Clostridium botulinum* produtores de toxinas dos tipos C e D;
- Grupo IV: *Clostridium argentinense*, produtores de toxina do tipo G;
- *Clostridium butyricum*, produtores de toxina do tipo E;
- *Clostridium baratii*, produtores de toxina do tipo F.

O agrupamento das espécies *Clostridium argentinense*, *Clostridium baratii*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium butyricum* foi justificado, pois elas podem produzir toxinas protéicas, as quais diferem em suas propriedades antigênicas, mas possuem atividades idênticas. O Quadro 1 apresenta as principais características dos seis grupos de clostrídios.

Em 2007, o primeiro genoma de uma estirpe de *Clostridium botulinum* foi publicado (Grupo I estirpe ATCC 3502) (Sebahia *et al.*, 2007), anunciando o início de uma nova era genômica destas bactérias. Atualmente, mais de 240 sequências, completas ou parciais, de genomas de *Clostridium botulinum* estão disponíveis no NCBI.

Tecnologias de sequenciamento de DNA e técnicas de bioinformática, agora disponíveis, estão permitindo aos pesquisadores comparar estirpes em um nível mais alto de resolução. Análises genômicas comparativas ilustram a diversidade de estirpes produtoras de neurotoxina botulínica e a plasticidade de estruturas genômicas onde o gene *bont* é encontrado. Eventos horizontais de transferência de genes, inserção e recombinação entre estirpes nos seis Grupos foram documentados, resultando em variações nas neurotoxinas botulínicas, nos *clusters* de genes da toxina e nas estruturas nas quais se encontram o mesmo tipo ou subtipo de toxina.

Quadro 1 – Características dos seis grupos de clostrídios filogeneticamente distintos, produtores de neurotoxinas botulínicas

<i>Clostridium</i> neurotoxigênico	<i>Clostridium botulinum</i> Grupo I (proteolítico)	<i>Clostridium botulinum</i> Grupo II (não proteolítico)	<i>Clostridium botulinum</i> Grupo III	<i>Clostridium botulinum</i> Grupo IV (<i>Clostridium argentinense</i>)	<i>Clostridium baratii</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
Neurotoxina produzida	A, B, F	B, E, F	C, D, C/D, D/C	G	F	E
<i>Clostridium</i> não-neurotoxigênico equivalente	<i>Clostridium sporogenes</i>		<i>Clostridium novyi</i>	<i>Clostridium subterminale</i>	Todas as estirpes típicas de <i>Clostridium baratii</i>	Todas as estirpes típicas de <i>Clostridium butyricum</i>
Fermenta glicose ^a	+	+	+	-	+	+
Fermenta frutose ^a	+/-	+	+/-	-	+	+
Fermenta maltose ^a	+/-	+	+/-	-	+	+
Fermenta sacarose ^a	-	+	-	-	+	+
Temperatura ótima de crescimento	37°C	25°C	40°C	37°C	30-45°C	30-37°C
Temperatura mínima de crescimento	10-12°C	2,5-3,0°C	15°C		10-15°C	12°C
pH mínimo para crescimento	4,6	5,0	5,1			4,8
Resistência do esporo ao aquecimento ^b	D _{121°C} = 0,21 min	D _{82,2°C} = 2,4 / 231 min ^c	D _{104°C} = 0,9 min	D _{104°C} = 1,1 min		D _{100°C} < 0,1 min

Fonte: Peck, 2009

Notas:

^a +, todas as estirpes; +/-, algumas estirpes são positivas e outras negativas; -, todas as estirpes negativas

^b Determinada em tampão fosfato pH 7,0

^c Valor de D sem/com lisozima durante a recuperação

O conhecimento da diversidade e das relações filogenéticas de estirpes produtoras de BoNT fornecem uma base para a compreensão da biologia e da genômica destes microorganismos. Tais informações podem ser utilizadas para caracterizar as estirpes em um nível de profundidade nunca antes alcançado, tornando inclusive possível certificá-las como materiais de referência.

3.2 As neurotoxinas botulínicas (BoNT)

As BoNTs são as toxinas mais potentes conhecidas pelos seres humanos. Em solução, é incolor, inodora e insípida. O consumo de uma pequena quantidade de alimentos contaminados com a toxina resulta em botulismo. As doses oral e inalatória estimadas são de aproximadamente 10 ng/kg e 1 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Devido à alta letalidade, as BoNTs são as únicas toxinas enquadradas como agentes de Nível Um do Programa Federal de Seleção de Agentes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Anniballi *et al.*, 2014).

Até o momento, sete variantes antigênicas de BoNTs foram confirmadas e nomeadas com letras de A a G. As sete BoNTs são sorologicamente distintas e diferem de 37 a 70% na sequência de aminoácidos.

Recentes isolados de BoNT foram propostos como novos sorotipos, incluindo BoNT/H (Barash, Arnon, 2014; Dover *et al.*, 2014), a qual foi posteriormente caracterizada como toxina quimérica BoNT/FA (Pellett *et al.*, 2016); e um sorotipo BoNT/X, que não é neutralizada por antissoros para outros sorotipos conhecidos de BoNT e cliva VAMP 2 (*Vesicle associated membrane protein*) em um novo site (Arg66 – Ala67) (Zhang *et al.*, 2017).

BoNT/A e B são as responsáveis pela maior parte dos casos de botulismo em humanos, enquanto BoNT/C e D estão associadas a doenças em animais. BoNT/E e F estão principalmente conectados a doenças em humanos, embora o tipo E também cause botulismo em peixes e em aves que se alimentam de peixes. BoNT/G foi até hoje associada a apenas um caso de botulismo em humano (Skarin, 2015).

Seis dos sete tipos de toxinas (BoNT A, B, C, D, E e F) têm variantes chamadas subtipos, os quais são categorizados com base em suas sequências de aminoácidos. Há atualmente 40 subtipos de toxinas reconhecidos, sendo que as diferenças de aminoácidos podem ser menores (1 a 7% de diferença dentro do tipo B) ou maiores (3 a 36% dentro do tipo F). Os subtipos são dados pela designação da letra da toxina seguida de um número. Por exemplo, há oito diferentes subtipos de BoNT A, designadas BoNT A1-A8 (Hill *et al.*, 2015). O número de subtipos tem crescido nos últimos anos, em virtude do aumento de sequenciamento de genomas completos, da espectrometria de massas, e da disponibilidade de anticorpos monoclonais de alta afinidade (Rossetto *et al.*, 2014).

Embora a maioria das espécies de *Clostridium botulinum* expressem apenas um sorotipo de toxina, alguns isolados produzem mais de um sorotipo, como as Ba, Bf, Bh, Ab, Af, onde as letras maiúsculas designam a toxina produzida em maior quantidade (Hill *et al.*, 2015).

Kalb *et al.* (2014) descreveram uma estirpe contendo três diferentes genes de neurotoxinas: *bont/A2*, *bont/F4* e *bont/F5*, e que produz as três neurotoxinas correspondentes. A estirpe, identificada como Af84, é proveniente da Argentina e mantida pelo *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases* (USAMRIID). Foi o primeiro registro de três neurotoxinas enzimaticamente ativas, produzidas por uma única estirpe de *Clostridium botulinum*.

As tipos quiméricos (mosaicos) C/D e D/C foram descritos na década de 1990 (Moriishi *et al.*, 1996a; Moriishi *et al.*, 1996b) e atualmente parecem estar muito mais envolvidos em focos de botulismo do que as BoNT de tipo C ou D. Isto pode provavelmente, ser devido aos diagnósticos melhorados que diferem entre as formas de tipo C, D e mosaicos, mas também pode ser porque são mais tóxicas para o seu hospedeiro do que os tipos C ou D típicos (Skarin, 2015; Nakamura *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2005).

3.2.1 Estrutura das BoNTs

As BoNTs são produzidas como cadeias polipeptídicas de 150 kDa, compostas por duas cadeias menores: uma cadeia pesada (HC) de 100 kDa, e uma cadeia leve (LC) de 50 kDa. As cadeias leve e pesada são mantidas juntas por uma longa fita de pepetídeo, com interações não-covalentes e uma única ligação dissulfeto entre as cadeias.

Seja em crescimento em meios de cultura, ou em cadáveres de animais ou em alimentos, os clostrídios liberam suas neurotoxinas como agregados de proteína. Estes agregados, designados toxinas progenitoras (PTX) ou complexos de toxina resultam da associação não covalente da neurotoxina com até sete outras proteínas conhecidas como proteínas associadas à neurotoxina (NAP). As NAPs incluem: uma proteína não tóxica não hemaglutinina (NTNH) e várias proteínas que possuem propriedades de hemaglutinação (HA) (Hines *et al.*, 2005).

As PTXs são encontradas em três formas com massa molecular de 900 kDa (19S, LL), 500 kDa (16S, L), e 300 kDa (12S, M). A PTX M é composta de uma BoNT e um componente NTNH. As PTXs L e LL são formadas por conjugação da PTX M com HAs e PTX LL é um dímero do PTX L. As estirpes do tipo A produzem três formas de PTXs (M, L e LL), enquanto que os tipos B, C e D produzem PTXs M e L. Em condições alcalinas, sem suco gástrico, as PTXs se dissociam em BoNTs e componentes não-tóxicos (Sakaguchi *et al.*, 2015).

Em estirpes dos sorotipos A-D, três tipos de hemaglutininas (HAs, três HA-70, três HA-17 e seis HA-33) estão associados com a PTX M, resultando na formação de um complexo de toxina (PTX L) de grande dimensão com 14-mero (14 resíduos de aminoácidos) (Miyashita *et al.*, 2016).

A BoNT ingerida por via oral encontra várias barreiras antes de entrar no corpo humano ou animal. As condições digestivas extremas no trato gastrointestinal representam a primeira destas barreiras. Enquanto a BoNT no complexo com a proteína NTNHA exibe notável tolerância a estas condições digestivas, a proteína BoNT quando está livre das proteínas não tóxicas é facilmente degradada em pequenos fragmentos no estômago e no intestino. A proteína NTNHA desempenha assim um papel na proteção da BoNT contra as condições digestivas nos tratos gastrointestinais de animais e seres humanos. A segunda barreira é a parede intestinal. Na ausência da proteína não tóxica, a BoNT pode ser transportada através das células epiteliais intestinais. Além disso, as proteínas HA facilitam a absorção trans-epitelial do complexo de toxina através de nove sítios de ligação de glicanos nas proteínas HA-33 e HA-70. Foi também demonstrado que o complexo BoNT do sorotipo A perturba a adesão à E-caderina, comprometendo assim as interações entre as células epiteliais. Este processo pode facilitar o transporte trans-epitelial do complexo de toxina (Miyashita *et al.*, 2016; Rossetto *et al.*, 2014). A Figura 1 representa o processo de formação do complexo da BoNT sorotipo D e seu processo de associação/dissociação em condições ácida e alcalina.

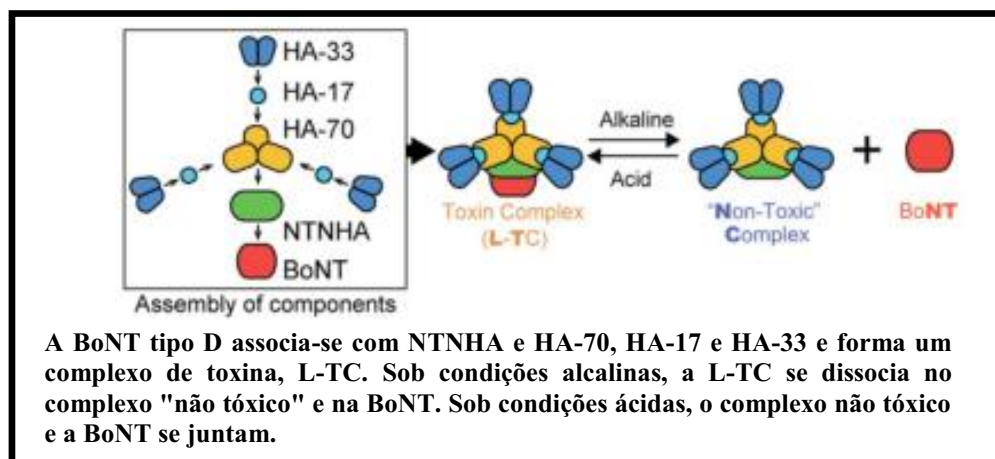


Figura 1 - Formação do complexo de toxina e seu processo de associação / dissociação
 Extraído de: Miyashita *et al.*, 2016

3.2.2 Mecanismo de ação das BoNTs

O mecanismo de ação das BoNTs pode ser dividido em três etapas: ligação, translocação e atividade enzimática. Na primeira etapa, a cadeia pesada (HC) se liga às membranas de neurônios, principalmente colinérgicos, por meio de um sistema duplo-receptor, constituído, em geral, por um gangliosídeo e um componente protéico (vide Quadro 2). Em seguida, a BoNT é translocada para o citoplasma neuronal via endocitose. Acredita-se que, durante esta etapa, a cadeia pesada (HC) forme poros na membrana, pelos quais a cadeia leve (LC) passa do meio extracelular para o intracelular neuronal. Finalmente, a cadeia leve (LC) (endoprotease, zinco-dependente) cliva uma ou mais proteínas SNARE, responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Como resultado, ocorre redução da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que

leva à inabilidade para contração muscular ou paralisia flácida dos músculos esqueléticos. (Peck *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2014).

Quadro 2 – Proteínas da vesícula sináptica que agem como receptores para BoNT

Serotype	Protein Receptor	Binding Site
BoNT/A	N-glycosylated SV2A, B, C	H _{CN} -H _{CC}
BoNT/B	Synaptotagmin I and II	H _{CC}
BoNT/C	—*	
BoNT/D	N-glycosylated SV2A, B, C	
BoNT/DC	Synaptotagmin I and II	H _{CC}
BoNT/E	N-glycosylated SV2A, B	H _{CN} -H _{CC}
BoNT/F	N-glycosylated SV2A, B, C	
BoNT/G	Synaptotagmin I and II	H _{CC}

Extraído de: Peck *et al.*, 2017

Nota:

*BoNT/C interage apenas com gangliosídeo, não foi identificado nenhum receptor protéico

Na condução deste processo, as BoNTs utilizam múltiplos domínios que respondem às diferentes funções no processo de intoxicação. O domínio N-terminal corresponde à cadeia leve, que exerce sua função como uma metaloprotease que se liga ao zinco, num motivo HExxH de ligação ao zinco, conservado em todos os tipos de BoNT. A cadeia leve codifica a porção tóxica, que cliva especificamente as proteínas SNARE, necessárias para a exocitose do neurotransmissor. Conforme apresentado na Figura 2, BoNT/A, C e E clivam SNAP-25 (*soluble NSF Attachment Protein*) em sítios distintos; BoNT/B, D, F e G clivam VAMP-1/2/3 em sítios distintos; BoNT/C pode também clivar syntaxin 1A/C (Peck *et al.*, 2017; Anniballi *et al.*, 2014).

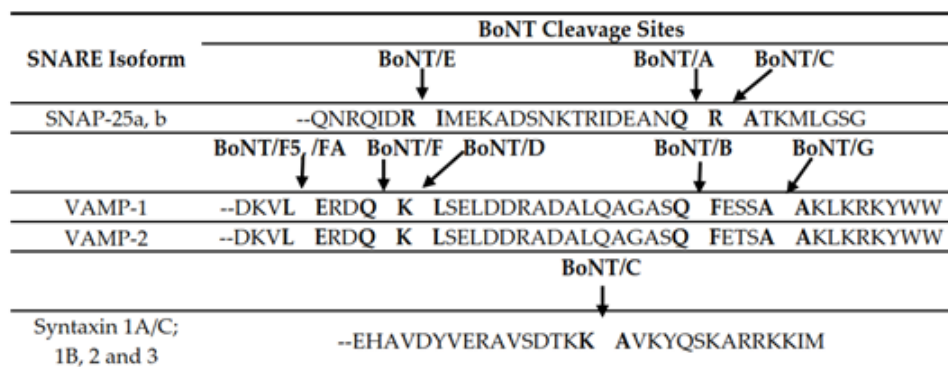


Figura 2 - Alvos enzimáticos e locais de clivagem de várias neurotoxinas botulínicas

Extraído de: Peck *et al.*, 2017

O segundo domínio é ligado à cadeia leve por uma ligação dissulfeto, e consiste no terminal N da cadeia pesada (H_N). Ele está envolvido na translocação da cadeia leve através da membrana, em vesículas endocitadas para o citosol neuronal. O terminal C da cadeia pesada (H_C) está ligado ao H_N e pode ser dividido em dois subdomínios (H_{CN} e H_{CC}). A função da terminação H_{CN} ainda não está totalmente elucidada, já o H_{CC} é responsável pela ligação neuro-específica das toxinas. A ligação neuro-específica ocorre através de uma interação dupla mediada por dois locais de ligação. O primeiro é muito semelhante entre os sorotipos e subtipos e liga à porção oligossacarídica de um polysialogangliosídeo, enquanto o segundo varia entre os sorotipos e se liga a diferentes receptores (Anniballi *et al.*, 2014).

Na Figura 3 está apresentado um exemplo da organização dos diferentes domínios da BoNT/C, BoNT/D e seus mosaicos.

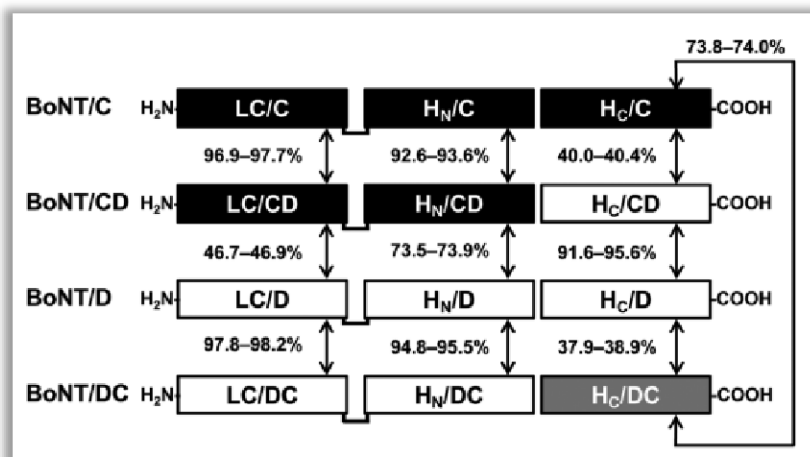


Figura 3 - Organização esquemática dos domínios da BoNT/C, BoNT/D e seus mosaicos (CD e DC). Cadeia leve (LC), cadeia pesada (HC), domínio de translocação N-terminal (HN), domínio de ligação ao receptor C-terminal (HC). Domínios altamente homólogos são indicados em cores semelhantes

Extraído de: Hansbauer *et al.*, 2016

3.3 Características genômicas

3.3.1 O locus da toxina botulínica

Os genes da neurotoxina e das proteínas não-tóxicas associadas estão agrupados em estreita proximidade e constituem o locus da toxina botulínica (*bont gene cluster*). Eles estão organizados em dois operons (Figura 4).

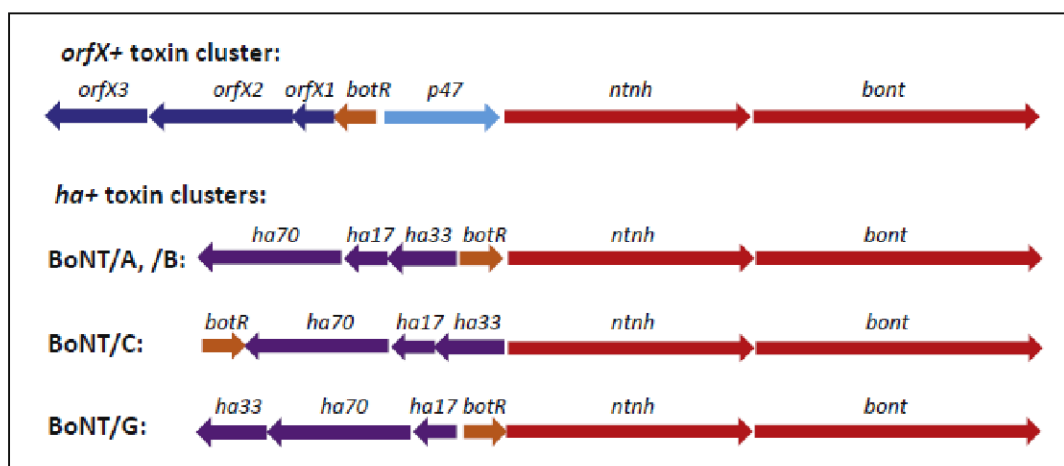


Figura 4 - Os clusters gênicos da BoNT com o código para as proteínas (*ha* e *ntnh*) que a envolvem e protegem, observados em estirpes toxigênicas

Extraído de: Hill *et al.*, 2015

Notas: A parte superior da figura mostra o orfX+ o cluster da toxina

A porção inferior da figura mostra três diferentes arranjos de ha+ clusters da toxina

O gene *bont* é imediatamente precedido do gene do componente NTNH. Ambos os genes formam um *operon* localizado na extremidade 3' do *locus* da toxina botulínica, o qual é bem conservado nos diferentes tipos de clostrídios produtores de BoNT.

Os genes *ha* e *orfX* que estão a montante dos genes *ntnh-bont* são transcritos na orientação oposta e formam um segundo *operon*. O *operon* HA (genes *ha33*, *ha17*, *ha70*) está associado com *bont/B*, *bont/C*, *bont/D*, *bont/G*, enquanto o *operon* OrfX (*orfX1*, *orfX2* e *orfX3*) está ligado a *bont/A2*, *bont/A3*, *bont/A4*, *bont/E* e *bont/F*. Um gene (*p47*) que codifica uma proteína de 47 kDa fica imediatamente a montante do gene *ntnh*. O gene *bont/A1* foi o único que foi encontrado nos *locus* HA ou OrfX da toxina botulínica. Um gene *botR*, o qual codifica para um fator sigma alternativo envolvido na regulação da expressão gênica do *locus* da toxina botulínica está presente em diferentes posições, em diferentes espécies de *Clostridium botulinum* (Popoff; Bouvet, 2013).

Os genes *bont* e *ntnha* estão bem próximos aos genes que codificam tanto para hemaglutinina quanto para proteínas OrfX. Também se sugere que essas proteínas associadas ao heterodímero BoNT-NTNHA tenham funções de proteção. Os produtos protéicos do *operon* hemaglutinina (que são HA17, HA33 e HA70) formam grandes complexos (conhecidos como complexos hemaglutinina) que interagem com o heterodímero BoNT-NTNHA, gerando grandes oligômeros conhecidos como toxinas progenitoras (PTX) ou complexos de toxina (Rossetto *et al.*, 2014).

Geralmente, uma estirpe de clostrídio produz apenas um tipo de neurotoxina e o *locus* da toxina botulínica está presente em uma única cópia no genoma. No entanto, algumas estirpes sintetizam duas diferentes BoNTs como BoNT/A-BoNT/B, BoNT/A-BoNT/F e BoNT/B-BoNT/F. As estirpes bivalentes possuem dois *loci botulinum*, e as duas neurotoxinas são produzidas em diferentes proporções. Algumas estirpes de clostrídio contêm genes silenciosos da neurotoxina. Gene silencioso para *bont/B* foi evidenciado em estirpes de *Clostridium subterminale* não-toxigênicas. Recentemente, uma estirpe de *Clostridium botulinum* abrigando 3 *loci* de *botulinum*, dois dos quais contendo *bont* subtipo A2 e F4, localizados no cromossoma e outro com *bont* F5 em um grande plasmídeo (Dover *et al.*, 2014; Popoff; Bouvet, 2013).

O gene *ntnh* é o gene mais conservado no *locus* de toxina botulínica em adição ao gene *bont*. Este gene está localizado em todos os *loci botulinum* a montante do gene *bont* e na mesma orientação (Popoff; Bouvet, 2013).

Genes *bont* foram sequenciados de um grande número de estirpes e variações na sequência têm sido identificadas para cada tipo de toxina. Assim, os tipos de toxina botulínica são divididos em subtipos, os quais são definidos como sequências de toxina variando de pelo menos 2,6% de identidade em nível de aminoácido (Quadro 3).

Quadro 3 – Tipos e subtipos de neurotoxinas botulínicas produzidas pelos seis diferentes grupos de *Clostridium* produtores dessas toxinas.

	<i>C. botulinum</i> Grupo I proteolítico	<i>C. botulinum</i> Grupo II não proteolítico	<i>C. botulinum</i> Grupo III	<i>C. argentinense</i> (ou Grupo IV)	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Tipos	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Subtipos*	A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3 A(B), Ab, Ba, Bf F1, F2, F3, F4, F5	E1, E2, E3, E6, E7, E8 não-proteolítico B, F6	C, D, C/D, D/C		E4, E5	F7

Fonte: Popoff e Bouvet, 2013.

Nota: * Outros subtipos já foram identificados. Hill *et al.* (2015) descreveu 8 subtipos BoNT/A (A1-A8, 8 subtipos BoNT/B (B1-B8) e 12 subtipos BoNT/E (E1-E12).

Embora duas toxinas possam mostrar um pequeno nível de variação na sequência, elas

podem ter diferenças marcantes de atividade, se a variação de aminoácido ocorrer em um sítio estratégico da toxina. Essas diferenças podem afetar a ligação e neutralização de anticorpos monoclonais e policlonais (Hill *et al.*, 2007).

O *cluster* do gene *bont* pode também estar presente em algumas estirpes de *Clostridium baratii* (algumas vezes referido como do Grupo V) e algumas estirpes de *Clostridium butyricum* (algumas vezes referido como do Grupo VI) (Skarin; Segerman, 2011).

3.3.2 Localização genômica do *locus* da neurotoxina botulínica

Os genes que codificam para diferentes tipos de BoNTs podem estar presentes em diferentes elementos genéticos, incluindo fagos, plasmídeos ou cromossomos dependendo da espécie e da estirpe do clostrídio. Os elementos genéticos móveis permitem a transferência horizontal entre diferentes isolados, o que se suspeita contribuir para a evolução do *loci bont* e consequentemente, para o grande número de BoNTs distintas atualmente conhecidas (Hill; Smith, 2013; Popoff; Bouvet, 2013).

A localização do *locus* de toxina botulínica no plasmídeo ou no cromossoma parece ocorrer não de maneira aleatória, mas em sítios específicos. A localização para cada sorotipo de neurotoxina é apresentada a seguir.

BoNT/A

BoNT/A é produzida por bactérias do Grupo I de *Clostridium botulinum* e atualmente consiste de 8 subtipos (BoNT/A1-A8) que têm diferenças de proteína maiores que 15%. A localização do gene *bont/A* dentro de uma estirpe pode estar dentro de um dos dois sítios no cromossoma (*operon arsC* ou *operon oppB / brnQ*), ou num sítio dentro de um grande plasmídeo do Grupo I. As localizações dos genes *bont* dentro dos plasmídeos do Grupo I são também conservadas. Os plasmídeos do Grupo I variam em tamanho (~150-270 kb), mas mostram frequentemente regiões significativas de sintonia (presença do mesmo *loci* genético em diferentes indivíduos). Além dos genes de BoNT/A localizados dentro de plasmídeos do grupo I, existe um segundo local que está algumas vezes associado com genes da toxina BoNT/B. O sítio de *bont/A* dentro dos plasmídeos do Grupo I pode conter *bont/A2*, */A3* ou */A4*, bem como, ocasionalmente *clusters* do gene *bont/F*. O local *bont/B* foi associado com genes *bont/B1*, */B2* e */B5*. Curiosamente, o gene *bont/A1* é o único subtipo de toxina que está localizado tanto no *cluster* do gene *ha* quanto no *orfX*. Isto é resultado de um evento de recombinação dentro do gene *ntnh* que precede o gene *bont* nos *clusters* de todas as toxinas (Hill *et al.*, 2015).

BoNT/B

BoNT/B é produzida por estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo I e Grupo II. As proteínas dos oito subtipos BoNT/B (B1-B8) diferem em 7%. Tal como com as estirpes do sorotipo A, o gene *bont/B* pode estar localizado dentro de um plasmídeo ou no cromossomo. Os plasmídeos contendo *bont B1*, */B2* e */B5* têm um sítio similar quando comparados aos do Grupo I. A localização do gene *bont/B2* no plasmídeo da estirpe Prevot 594, recentemente sequenciada, proporciona outro exemplo de que o mesmo subtipo de toxina pode estar dentro de uma localização cromossômica ou plasmídica (Smith *et al.*, 2015).

BoNT/C e BoNT/D

BoNT/C e BoNT/D são produzidos por estirpes do *Clostridium botulinum* do Grupo III e seus *bont* genes estão localizados em um fago. Análises moleculares do genoma do fago revelaram que embora esse fago tenha um DNA linear com 404 bp repetições em série, ele existe como um plasmídeo circular pró-fago na bactéria na fase lisogênica e não se integra ao

cromossoma do hospedeiro (Popoff; Bouvet, 2013; Skarin *et al.*, 2011).

Os genes *bont/C* e *bont/D* das toxinas foram recombinados para formar BoNTs mosaicos ou quiméricas que são designados como BoNT C/D e BoNT D/C. As BoNTs quiméricas são consideradas variantes ou subtipos, que diferem em até 23% no nível de aminoácidos. Enquanto os genes da toxina BoNT/C1 estão dentro do *cluster* *ha*, o arranjo do *cluster* difere de outros uma vez que o gene regulador da transcrição (*botR*) se moveu para o terminal 5' do *cluster* e a orientação agora é de 5' para 3', em vez da direção 3' para 5', observada em outros *clusters* do gene *ha* (Hill *et al.*, 2015).

BoNT/E

BoNT/E é produzida por estirpes do tipo E de *Clostridium botulinum* do Grupo II ou *Clostridium butyricum* do Grupo VI e consiste em 12 subtipos. As proteínas BoNT/E1-E12 variam em até 11%. O gene *bont/E* pode estar localizado dentro do cromossoma ou dentro de um plasmídeo de aproximadamente 146 kb (Zhang *et al.*, 2013). As poucas sequências genômicas de *Clostridium butyricum* do Grupo VI mostram uma localização cromossômica para o *bont/E*. A presença do gene *bont/E* nas estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo II e *Clostridium butyricum* do Grupo VI resulta de um evento de inserção envolvendo uma *resolvase*, codificada pelo gene *rara* que é uma recombinase associada a *transposases* (Hill *et al.*, 2015; Popoff; Bouvet, 2013).

BoNT/F

BoNT/F é produzida por três espécies de bactérias, estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo I ou Grupo II e *Clostridium baratii* do Grupo V. A variação da sequência protéica entre os subtipos BoNT/F1-F7 pode ser de até 36%, tornando estes os subtipos mais diversos dentro de qualquer sorotipo. Nas estirpes do Grupo I, o gene *bont/F1* partilha o mesmo local no cromossoma do *operon* *arsC*, como é observado com o *orfX* do *bont/A1* ou */A2*. No entanto, o *bont/F4* está localizado no sítio *pulE* do cromossoma, enquanto que o *bont/F2* e */F5* estão localizados dentro de um plasmídeo (no mesmo local que os *bont /A2*, */A3* ou */A4* nos plasmídeos do Grupo I). Nas estirpes do Grupo II de *Clostridium botulinum*, o gene *bont/F6* está localizado num sítio cromossômico designado *topB*, para o gene que codifica a topoisomerase BIII. Dentro do *Clostridium baratii* do Grupo V, o *bont/F7* também é encontrado dentro do cromossomo (Hill *et al.*, 2015).

As estirpes do sorotipo F ilustram diferentes exemplos de eventos de inserção e recombinação. O *bont/F6* é resultado de um evento de recombinação entre *bont/F1* e *bont/F2*. É importante notar que enquanto o gene *bont/F6* encontra-se nas estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo II, os *bont/F1* e */F2* são encontrados nas estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo I. Isto indica não só um evento de recombinação, mas também um evento de transferência horizontal de genes inter-espécie. Outro exemplo foi demonstrado pela sequência cromossômica de uma estirpe de *Clostridium baratii* do Grupo V produtora de BoNT/F7, onde o *cluster* da toxina BoNT/F7 era flanqueado por repetições diretas de 1182 elementos de sequências de inserção (IS), que possuem 99% de identidade entre si. As repetições diretas dos elementos IS intactos podem explicar o movimento do gene *bont/F7* para a espécie *Clostridium baratii* (Hill *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015).

BoNT/G

A BoNT/G é produzida pelo *Clostridium botulinum* do Grupo IV, atualmente designado como *Clostridium argentinense* do Grupo IV. As estirpes produtoras de BoNT/G são raras e só recentemente tiveram um genoma sequenciado, a partir da estirpe CDC 2741. A análise da sequência do *cluster* da toxina BoNT/G revelou que está dentro de um *cluster* de genes *ha* que

contém três genes de hemaglutinina (*ha70*, *ha17* e *ha33*), mas o arranjo do gene é diferente de outros *clusters* ha, sendo o gene da hemaglutinina inicial *ha33*, e não *ha70*. O exame do gene *ha33* dentro do *cluster* da toxina BoNT/G mostrou que ele tinha a maior semelhança com o *ha33* encontrado nas estirpes dos sorotipo C e D, e estava mais distantemente relacionado ao *ha33* das estirpes de sorotipo A ou B (Hill *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015).

Resultados publicados por Zhou *et al.* (1995) descreveram a localização de genes similares a *bont/G* em um plasmídeo, enquanto Smith *et al.* (2015) encontraram o gene *bont/G* durante o sequenciamento da estirpe *Clostridium argentinense* G CDC 2741, localizado em uma grande *contig*, provavelmente cromossômica.

3.3.3 Evolução do gene das toxinas clostridiais

A presença do mesmo gene de toxina em diferentes espécies bacterianas ilustra eventos de inserção ou transferência horizontal de genes. Por exemplo, a similaridade entre diferentes BoNTs, assim como com a toxina tetânica (TeNT), o fato de diferentes espécies de *Clostridium* poderem produzir BoNT e de que algumas estirpes contêm combinações dos genes *bont*, sugerem fortemente que os genes *bont* e *tent* derivam de um ancestral comum e foram transferidos entre estirpes de *Clostridium* (Popoff; Bouvet, 2013).

A transferência horizontal de DNA através de conjugação, transdução ou transformação ocorre recorrentemente dentro e entre espécies intimamente relacionadas, mas também pode ocorrer ocasionalmente entre espécies mais afastadas. Esses mecanismos são importantes para que o organismo se adapte a novos ambientes. A transferência horizontal é ainda mais acelerada pela plasticidade genômica induzida por *transposons*. Os *transposons* podem usar um mecanismo de "copiar e colar" (Classe I) ou um mecanismo de "recortar e colar" (Classe II). As sequências de inserção (IS) são elementos transponíveis curtos que codificam proteínas necessárias para a atividade dos *transposons* (Miller; Capy, 2004).

A transferência horizontal do gene da toxina pode ser facilitada por diferentes mecanismos, incluindo a presença da toxina dentro de elementos móveis tais como plasmídeos ou fagos, a associação da toxina com *transposons* ou sequências de inserção (IS), ou a presença de sequências repetidas diretas nas regiões flanqueando o *cluster* do gene da toxina, que podem proporcionar um local de direcionamento e inserção. A mobilidade do *cluster* do gene da toxina e sua presença em diferentes espécies bacterianas proporciona a oportunidade para que as toxinas evoluam dentro de diferentes contextos bacterianos e diferentes ambientes, através de recombinação genética, resultando na diversidade de toxinas que já foram identificadas (Hill *et al.*, 2015).

As alterações nas sequências de toxinas através de eventos de recombinação podem resultar na criação de novos subtipos. Estirpes bivalentes, produzindo toxinas Ab, Ba, Af ou Bf, assim como estirpes contendo um gene *bont/B* silencioso, indicam transferência horizontal de genes, provavelmente mediadas por elementos genéticos móveis (Popoff; Bouvet, 2013).

Rearranjos, provavelmente por recombinação homóloga, também parecem ter ocorrido entre genes do *locus* da toxina botulínica de diferentes tipos de bactérias neurotoxigênicas. Isso é sugerido pela identificação de estirpes atípicas carregando genes mosaicos contendo elementos derivados de *Clostridium botulinum* C e D, ou mosaicos de genes *ntnh* de *Clostridium botulinum* A e C, ou dos proteolíticos *Clostridium botulinum* A, B e F (Popoff; Bouvet, 2013).

Estirpes clostridiais toxigênicas são responsáveis por surtos, mas transferência horizontal de gene para estirpes não-toxigênicas pode ocorrer, incluindo a transferência do *loci* codificante para toxina, o que faz com que estirpes não-toxigênicas passem a ser toxigênicas (Rossetto *et al.*, 2014).

Dado o histórico de translocação horizontal do *cluster* do gene *bont*, poderia-se esperar vários sítios diferentes de inserção no genoma. No entanto, análises de sequências genômicas sugerem que o *cluster* do gene *bont* é encontrado em um número restrito de *loci* cromossômicos ou plasmidiais (Skarin; Segerman, 2011).

Várias espécies de *Clostridium* produzem BoNT e algumas estirpes expressam combinações de genes de BoNT, sugerindo fortemente que o gene de BoNT foi derivado de um antepassado comum e foi transferido horizontalmente entre as espécies de *Clostridium*. Entre as bactérias, o grupo Clostridia produz o maior número de toxinas. Curiosamente, os genes de toxina relacionados foram identificados entre espécies distintas de *Clostridium*, indicando transferências de genes horizontais não só de genes relacionados com BoNT entre estirpes.

Doxey *et al.* (2008) demonstraram que as proteínas BoNT e NTNHA evoluíram a partir de um ancestral comum semelhante à colagenase através de duplicação genética e que o gene *ntnha* evoluiu para ter uma função protetora da toxina contra, por exemplo, desnaturação por pH, proteases ou outros agentes que possam modificar proteínas.

Miyata *et al.* (2015) demonstraram que existem pelo menos três tipos de genes HA-33 e que estes genes são reorganizados entre as estirpes dos sorotipos C e D, independentemente do sorotipo de BoNT. A duplicação, reorganização e rearranjo dos genes no grupo de genes BoNT e seus genes vizinhos podem ter levado à hibridação funcional, resultando no complexo de toxina botulínica. Mansfield *et al.* (2015) identificaram ainda *clusters* codificando BoNT e NTNHA homólogos em outra espécie bacteriana, *Weissella oryzae* SG25, que não contém genes HA. Estes achados podem indicar que a transferência horizontal do gene BoNT acompanha sempre o gene NTNHA e que o complexo BoNT / NTNHA (PTX M) nos sorotipos A-D formaram o complexo HA por acaso durante a evolução da bactéria. As estirpes de sorotipo E e F, no entanto, não contêm os genes para HAs. Em vez do *cluster* do gene HA, estas estirpes possuem o *cluster* do gene *orfx*, cuja função ainda não está bem estabelecida. Durante o evento horizontal de transferência de genes, o *cluster* dos genes BoNT / NTNHA dos sorotipos E e F parecem ter "saltado" a montante do *cluster* *orfx*, enquanto que os correspondentes *clusters* dos outros sorotipos foram inseridos a jusante do *cluster* do gene HA (Miyashita *et al.*, 2016).

A partir de resultados relatados por Miyashita *et al.* (2016) foi apresentada uma hipótese de que o complexo PTX L dos sorotipos C e D seja um híbrido funcional que exhibe tanto neurotoxicidade quanto citotoxicidade por vacuolização, resultante da transferência horizontal do *cluster* do gene BoNT-NTNHA para uma bactéria hipotética produtora de toxinas formadoras de vacúolos. A citotoxicidade por formação de vacúolos parece estar restrita aos sorotipos C e D. Nos sorotipos A e B, observa-se que os complexos PTX L ligam-se diretamente à E-caderina e interrompem as interações célula-célula mediadas por E-caderina. O complexo "não tóxico" dos sorotipos A e B podem, portanto, ter perdido os seus efeitos de citotoxicidade por formação de vacúolos antes ou depois da transferência horizontal do gene BoNT e, em vez disso, evoluiu para interromper as interações célula-célula mediadas por E-caderina.

Outra evidência sugere fortemente que todas as variantes de BoNT e NTNH derivam de um gene ancestral comum por duplicação e posterior remodelação independente. NTNH não possui um motivo HExxH catalítico, mas outro, de ligação ao zinco, na mesma posição. De fato, NTNH se liga a um átomo de zinco por molécula, mas não exibe atividade proteolítica. Uma hipótese é que o domínio catalítico tenha sido derivado de uma proteína viral ancestral, a qual teria sido fundida com um sistema de liberação consistindo da cadeia pesada, a qual contém os domínios de ligação ao receptor e translocação (Popoff; Bouvet, 2013).

Duplicação gênica parece ser um mecanismo comum na evolução do gene da toxina. Um exemplo adicional é a enzima C3 e a toxina C2 produzidas pelo *Clostridium botulinum*

tipos C e D. C3 é uma proteína de 25 kDa contendo o sítio de ribosilação do ADP (difosfato de adenosina), caracterizado pelo motivo QLE. Em contraste, o componente enzimático C2-I é uma proteína de 50 kDa, abrangendo dois domínios estruturais relacionados, de mesmo tamanho. Se especula que o C2-I seja derivado de uma duplicação do gene C3 (Popoff; Bouvet, 2013).

3.3.4 Comparações genômicas

Todas as estirpes produtoras de BoNT (independentemente do tipo de toxina) estão estreitamente relacionadas às suas propriedades fenotípicas, homologia DNA/DNA, análises rRNA 16S e conteúdo G+C entre 26 e 28% (Popoff; Bouvet, 2013).

O primeiro genoma completo de *Clostridium botulinum* foi publicado em 2007 (Sebahia *et al.*, 2007). Atualmente, muitos genomas completos e sequenciamentos de genes codificadores de toxinas estão disponíveis. O sequenciamento confirmou a distinção entre os sete sorotipos das neurotoxinas botulínicas, com diferenças de aminoácidos entre os sorotipos, que ficam na faixa de 37,2 a 69,6% (Hill; Smith, 2013).

Com o aumento de informações genéticas sobre os clostrídios produtores de BoNT, foi descoberto que diferentes grupos de *Clostridium botulinum* são mais estreitamente relacionados a outras espécies de clostrídios do que aos próprios grupos de *Clostridium botulinum*. A Figura 5 apresenta a relação entre estas diferentes espécies.

Percebe-se pelo dendograma filogenético apresentado na Figura 5 que, por exemplo, *Clostridium botulinum* Grupo I é mais próximo ao *Clostridium sporogenes*, e *Clostridium botulinum* Grupo III estão mais estreitamente relacionadas ao *Clostridium novyi* e *Clostridium haemolyticum* do que aos sorotipos de *Clostridium botulinum* dos grupos I e II (Skarin *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2007; Sasaki *et al.* 2001).

Os genes compartilhados entre *Clostridium botulinum* e outros clostrídios codificam, principalmente, para funções básicas como: divisão celular, biossíntese de macromoléculas, metabolismo central/intermediário e germinação/esporeação. Os genes específicos do *Clostridium botulinum* estão espalhados por todo o genoma e não são agrupados em regiões específicas. Eles parecem estar envolvidos em funções acessórias incluindo proteínas de transporte/metabolismo, metabolismo energético, proteínas de superfície celular e regulação (Sebahia *et al.*, 2007).

Os genomas de *Clostridium botulinum* do grupo I e II consistem em um cromossoma de DNA circular, cujo tamanho (3 659 644 a 4 155 278 pb) está na mesma faixa de outros genomas conhecidos de *Clostridium* (*Clostridium perfringens* 3031 430 pb; *Clostridium difficile* 4 290 252 bp; *Clostridium acetobutylicum* 3 940252 bp), exceto os de uma estirpe C/D do Grupo III (2 773 191 pb) e *Clostridium tetani* (2 799 250 pb) que são consideravelmente menores. A maioria das estirpes também possuem plasmídeos que variam em tamanho (16 kbp-270 kbp) (Popoff; Bouvet, 2013).

O genoma de *Clostridium botulinum* A (estirpe Hall) (Sebahia *et al.*, 2007) partilha 1126 (31%) a 1565 (43%) genes com os genomas de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* e *Clostridium tetani*, confirmando a heterogeneidade do gênero *Clostridium*. *Clostridium botulinum* A compartilha um maior número de genes ortólogos (genes que possuem um ancestral comum e funções iguais) com *Clostridium acetobutylicum* (43%), o qual é um *Clostridium* não toxigênico, do que com os outros clostrídios toxigênicos. Dentre os clostrídios toxigênicos sequenciados, o mais relacionado ao *Clostridium botulinum* A é o *Clostridium tetani* (40% de genes ortólogos) que também sintetiza uma neurotoxina relacionada com a neurotoxina botulínica. Por outro lado, o mais distante é o *Clostridium perfringens* (31% de genes ortólogos).

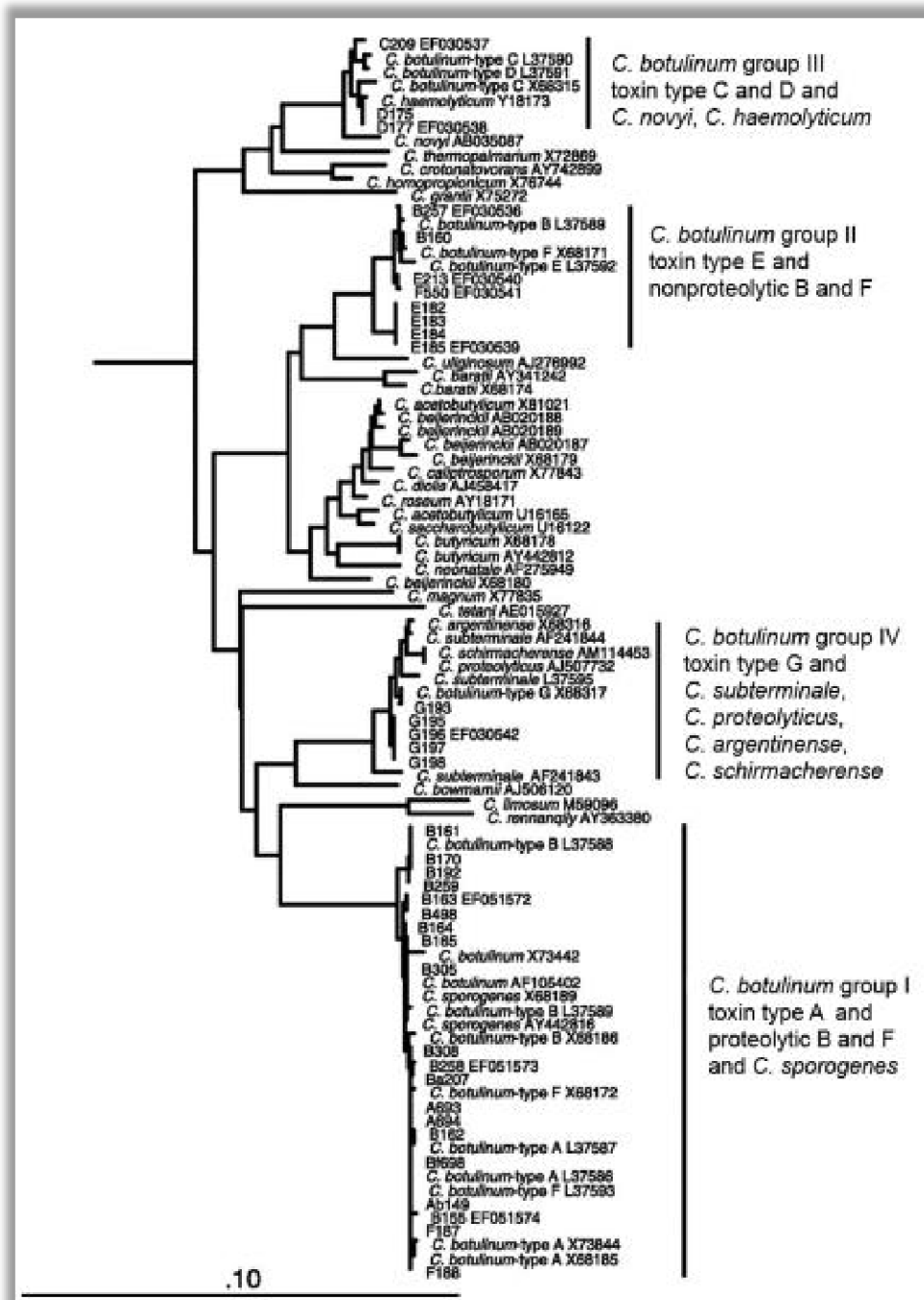


Figura 5 - Dendrograma filogenético de espécies de *Clostridium* baseado na seqüência de genes 16S rRNA (Hill *et al.*, 2007). Uma árvore com 90 seqüências representativas é mostrada e ilustra a diversidade genética dentro dos clostrídios. *Clostridium botulinum* dos Grupos I, II, III e IV estão intercalados entre 27 outras espécies clostridiais nesta árvore. A árvore foi construída usando um alinhamento de seqüências 16S rRNA, que tinha 1.329 bases de comprimento após a remoção de colunas contendo mais de 80% de lacunas. A barra de escala indica a distância equivalente a 0,1 mutações por local (por exemplo, o gene 16S rRNA da estirpe F188 do grupo *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani* são 91,7% idênticos)
 Extraído de: Peck, 2009

No genoma de *Clostridium botulinum* A ATCC3502 (Sebaihia *et al.*, 2007) foram encontrados: apenas dois profagos, dois profagos remanescentes, genes *transposase* sendo um funcional e 11 não funcionais. Uma proporção relativamente baixa (0,8-6,8%) dos genes são preditos (previsão de Colombo) de serem adquiridos horizontalmente em genomas de *Clostridium botulinum*. No entanto, esta porção é significativamente mais elevada nas estirpes do grupo I (4,5-6,8% de todos os genes) do que nas estirpes do grupo II (0,8-1,2%).

Uma comparação global entre os genomas completos de *Clostridium botulinum* revelou alta similaridade entre os genomas das estirpes do Grupo I e sua grande distância em relação às estirpes do Grupo II. Mesmo com a maioria das proteínas (81-86%) das estirpes do Grupo I compartilhando uma identidade proteica superior a 90%, apenas 2-3% das proteínas dos genomas do Grupo II têm ortólogos codificados nos genomas do Grupo I. Aplicando um corte menos rigoroso (10% de identidade de proteína), as estirpes do Grupo I e do Grupo II compartilham apenas 48% do seu proteoma. Além disso, quase não existe sintonia genômica entre as estirpes do Grupo I e do Grupo II, exceto uma região em torno da origem de replicação. O fato de que os genomas de 6 estirpes do Grupo I (três *Clostridium botulinum* A1, uma de *Clostridium botulinum* A3, uma proteolítica de *Clostridium botulinum* B1 e uma proteolítica de *Clostridium botulinum* F) serem altamente similares, confirma análises genéticas anteriores indicando que o Grupo I de *Clostridium botulinum* forma uma espécie bacteriana homogênea distinta dos outros tipos de *Clostridium botulinum* (Popoff; Bouvet, 2013).

Embora estirpes de *Clostridium botulinum* A mostrem rearranjos genômicos limitados no *locus* da toxina botulínica, foi desenhado uma análise de MLST (*multilocus sequence typing*) para diferenciar os seus subtipos. Dez regiões VNTR (*variable-number tandem repeat*) dispersas no genoma de *Clostridium botulinum* A ATCC3502, distantes do *locus* da toxina botulínica, permitiram diferenciar as estirpes em subtipos A1-A4 e distinguir 30 genótipos dentro de 53 estirpes de subtipo A1 (Macdonald *et al.*, 2011). MLST baseado em 7 genes *housekeeping* também foi proposto para subtipagem e análise filogenética de *Clostridium botulinum* A. Assim, 24 linhagens foram identificadas a partir de 73 estirpes de *Clostridium botulinum* A (Jacobson *et al.*, 2009). A organização dos cromossomos das estirpes *Clostridium botulinum* A, B e F do grupo I é também compartilhada por *Clostridium sporogenes* (Hill *et al.*, 2009), confirmando que esta espécie de *Clostridium* está muito próxima das estirpes proteolíticas de *Clostridium botulinum*, exceto pela ausência do gene da neurotoxina.

Curiosamente, as sequências genômicas das estirpes do Grupo III são muito diferentes daquelas dos Grupos I e II, e serão discutidas na seção seguinte.

Dois estirpes *Clostridium botulinum* E (Beluga E1 e Alaska E3) e a estirpe não-proteolítica *Clostridium botulinum* B Eklund 17B compartilham sintonia cromossômica, indicando que as estirpes do Grupo II contêm estruturas cromossômicas relacionadas, distintas do *Clostridium butyricum* E (Hill *et al.*, 2009).

Genomas completos de seis estirpes clostridiais produtoras de neurotoxinas botulínicas foram sequenciados por Smith *et al.* (2015), com o objetivo de prover referências para tipos de toxinas menos comuns, bivalentes ou não usuais. As amostras incluíram: três estirpes do Grupo I de *Clostridium botulinum* (CDC 297, CDC 1436 e Prevot 594), uma estirpe *Clostridium botulinum* do Grupo II (Eklund 202F), uma estirpe *Clostridium argentinense* do Grupo IV (CDC 2741) e uma de *Clostridium baratii* do Grupo V (Sullivan). As informações do sequenciamento e os números de acesso no GenBank (*NIH genetic sequence database*) estão apresentados no Quadro 4.

3.3.5 *Clostridium botulinum* do Grupo III

Nas estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, foi claramente evidenciado que a

BoNT é codificada por bacteriófagos. Uma relação pseudolisogênica correspondente à presença de bacteriófagos livres no citoplasma bacteriano, existe entre estes fagos e os hospedeiros. Assim, variantes livres de bacteriófagos podem ser obtidas com alta frequência usando reagentes curativos como laranja de acridina e luz ultravioleta. Em culturas de laboratório, uma proporção de bactérias é lisada e perde os bacteriófagos livres, que podem reinfecá-las. Esses ciclos de lisogenia e reinfecção ocorrem provavelmente no ambiente (solo, trato intestinal) e são responsáveis por isolamentos de variantes não toxigênicas ou produtores de pouca toxina. Estirpes de *Clostridium botulinum* C e D curadas dos seus fagos não produzem BoNT/C e BoNT/D respectivamente. Estas bactérias podem ser convertidas em estirpes neurotoxigênicas C e D por reinfecção com os fagos obtidos de estirpes toxigênicas de *Clostridium botulinum* C e D (Oguma, 1976).

Quadro 4 – Informações sobre classificação, origem, tipificação, sequenciamento genômico e os números de acesso no GenBank das estirpes de clostrídios produtores de BoNT sequenciadas por Smith *et al.* (2015)

Espécies	<i>C. botulinum</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. argentinense</i>	<i>C. baratii</i>
Grupo	Grupo I	Grupo I	Grupo I	Grupo II	Grupo IV	Grupo V
Estirpe	CDC 297	CDC 1436	Prevot 594	Eklund 202F	CDC 2741	Sullivan
Sorotipo	HA-A1	A2/b5	B2	F6	G	F7
Fonte do isolamento	Pasta de fígado	Fezes de bebê	Presunto	Sedimentos marinhos	Baço (autópsia)	Fezes de adulto
Local/Data	Nova Iorque <1969	Utah, 1977	França, 1951	Costa do Pacífico, EUA, 1965	Suíça, 1977	Nova Iorque, 2007
Identificação locus	CBF	CBG	CBH	CBI	CAD	CBJ
Cobertura genoma						
Roche 454	21X	25X	37,1X	32,1	9,9X	44,2
Illumina	476,9X	277,1X	275X	292X	171,8X	321X
GAii						
Status de montagem do genoma	Finalizado	Finalizado	Finalizado (1 gap no cromossomo)	Finalizado	20 contigs	Finalizado
Tamanho genoma (bp)	3.905.789	4.089.687	4.089.687	3.874.462	4,4 Mb	3.153.266
G + C (%)	28,3	27,9	27,9	27,5	28,6	28,0%
Nome plasmídeo	pCBF	pCBG	pCBH	pCBI	Não determinado	pCBJ
Tamanho plasmídeo	13.761	275.987	257.338		Não determinado	185.364
Toxina dentro do plasmídeo	Não	Sim	Sim	Não	n/a	Não
Nº acesso GenBank						
Cromossomo	CP006907	CP006908	CP006901	CP006903	AYSO0000000	CP006905
Plasmídeo	n/a	CP006909	CP006902	CP006904	n/a	CP006906

Fonte: Smith *et al.*, 2015

Além das BoNT, algumas estirpes dos tipos C e D produzem toxina C2 e uma exoenzima C3. A toxina C2 é uma toxina binária, que não é uma BoNT, mas sim uma entero- ou citotoxina, que tem a capacidade de ribolisar enzimaticamente o ADP da actina não muscular. Algumas estirpes tipo C e D produzem apenas toxina C2, enquanto outras produzem toxina C2 em adição a BoNT\C ou BoNT\D. As estirpes que produzem apenas a toxina C2 têm geralmente pouca letalidade para os camundongos e, portanto, são descritas como "não-toxigênicas". Já a exoenzima C3, ribosila ADP de proteínas de baixo peso molecular que se ligam a GTP (guanosina trifosfato) (Sakaguchi *et al.*, 2015).

O sorotipo das estirpes de *Clostridium* é geralmente determinado por teste de neutralização de toxina com antitoxinas específicas (Lindstrom; Korkeala, 2006). No entanto,

nos tipos C e D, observou-se que soros obtidos de animais altamente imunizados pelo toxóide do tipo C podiam neutralizar a toxina do tipo D, com taxas variáveis, e vice-versa (Moriishi *et al.*, 1989; Oguma *et al.*, 1984; Ochanda *et al.*, 1984; Oguma *et al.*, 1980).

Historicamente, o uso de métodos sorológicos para identificar e caracterizar neurotoxinas botulínicas não foi isento de problemas. Em 1924, foram encontradas incoerências ao testar a neurotoxina formada por estirpes de BoNT/C recém-identificadas. Descobriu-se que as antitoxinas produzidas a partir de estirpes do tipo C, que tinham sido isoladas de larvas e galinhas, eram capazes de neutralizar a neurotoxina tipo C de várias estirpes isoladas nos EUA, assim como a da estirpe “Seddon” tipo C que foi isolada de bovinos com botulismo na Austrália. Porém, as antitoxinas produzidas a partir da estirpe “Seddon” neutralizaram apenas a sua toxina homóloga. Sabe-se agora que estas toxinas do tipo C se tratavam de mosaicos (BoNT/CD), com sequência composta por 2/3 tipo C e 1/3 tipo D, ao passo que as toxinas do tipo C1 verdadeiras são produzidas por estirpes do tipo “Seddon” (Moriishi *et al.*, 1996a).

Resultados de caracterização na década de 1990, demonstraram que BoNT/C1 das estirpes Stockholm e 468 partilhavam 99,9% de identidade na sequência de nucleotídeos (Kimura *et al.*, 1990; Hauser *et al.*, 1990). Similarmente, a BoNT/D das estirpes 1873 e CB-16 também compartilhavam 99,9% de identidade de sequência de DNA (Nakajima *et al.*, 1998; Sunagawa *et al.*, 1992). No entanto, já se observava que neurotoxinas de outras BoNT/C e BoNT/D exibiam uma reatividade inconsistente às antitoxinas BoNT/C e BoNT/D (Moriishi *et al.*, 1989; Terajima *et al.*, 1985; Ochanda *et al.*, 1984; Oguma *et al.*, 1984), sugerindo a existência de mosaicos. A caracterização da BoNT da estirpe C 6813 por Moriishi *et al.* (1996b), demonstrou que essa se tratava de um mosaico C/D, tendo 95% de identidade com BoNT/C1, diferindo em um terço do seu C-terminal, o qual é similar ao da BoNT/D. Similarmente, o sequenciamento do bacteriófago da linhagem Sul-africana de BoNT/D (Dsa), por Moriishi *et al.* (1996a), mostrou que a sua LC tem uma alta identidade de aminoácidos com BoNT/D LC (96%) e H_N (92%), mas compartilha apenas 78 e 40% de identidade com a parte H_C da BoNT/C1 e da BoNT/D.

Com esses estudos, ficou demonstrado que a distinção entre os tipos C e D não é absoluta, podendo existir também sequências quiméricas C/D e D/C. Observou-se que a homologia das sequências de aminoácidos na região N-terminal (H_N; ~50 kDa) da cadeia pesada é muito alta, mas aquelas da cadeia leve e da região C-terminal da cadeia pesada (H_C; ~50 kDa) são diferentes dependendo das toxinas. BoNT/DC é constituído por dois terços da BoNT/D, incluindo cadeia leve e H_N, e um terço de BoNT/C, correspondente à porção H_C. BoNT/CD consiste na estrutura inversa (Figura 6) (Sakaguchi *et al.*, 2015; Woudstra *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2013).

As ligações das BoNT/C e BoNT/D ao gangliosídeo parecem ser mais complexas do que as desvendadas até o momento para outros sorotipos. Em primeiro lugar, elas não possuem o sítio de ligação ao gangliosídeo (GBS) conservado. Porém, na mesma área das proteínas, foram observados sítios análogos, que se ligam a gangliosídeos, sugerindo um modelo de ligação distinto (Berntsson *et al.*, 2013).

As BoNT/C e D possuem uma alça hidrofóbica exposta (denominada alça de ligação ao gangliosídeo (GBL) ou loop WY), em contraste a outros sorotipos. Foi demonstrado que mutações nessa alça claramente interrompem a ligação aos gangliosídeos, sugerindo seu envolvimento nesse processo. Além disso, uma estrutura recentemente descoberta na BoNT/C revelou um sítio de ligação ao ácido siálico (Sia-1), localizado em uma região diferente do GBS (Strotmeier *et al.*, 2011). Mutações no sítio Sia-1 reduzem a ligação gangliosídica. Portanto, supõe-se que o local de ligação do ácido siálico e a GBL sejam partes diferentes da mesma área de interação ao gangliosídeo.

Também foi sugerido que a BoNT/C pode não precisar de um receptor de proteína

(Tsukamoto *et al.*, 2005). Em vez disso, pode se ligar aos neurônios através de múltiplos gangliosídeos (Strotmeier *et al.*, 2011; Karalewitz *et al.*, 2010).

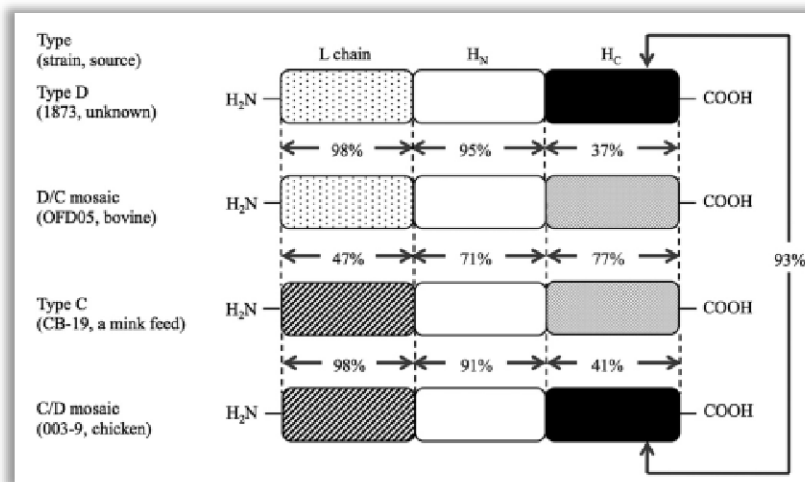


Figura 6 - Representação esquemática de BoNTs tipos C e D. As homologias das sequências de aminoácidos para a cadeia leve (L), cadeia pesada N-terminal (H_N) e C-terminal (H_C) são mostradas entre as barras. As regiões que mostram mais de 70% de homologia são indicadas com o mesmo padrão

Extraído de: Nakamura *et al.*, 2012

Nakamura *et al.* (2012) mostraram que BoNT/DC é um agente altamente tóxico para bovinos e camundongos, e possui especificidade imunológica. A entrada de BoNT/DC nos neurônios não é bloqueada pela competição com BoNT/C ou BoNT/D, uma indicação de que diferentes receptores para esses três sorotipos são utilizados na ligação à membrana. A divergência de sequência observada no domínio de ligação ao receptor do BoNT Dsa (um mosaico D/C) parece ser única entre as BoNT. A região H_C da BoNT D/C contém aproximadamente 23% de sequência única que difere de qualquer outro sorotipo, incluindo C1 e D (Webb *et al.*, 2007).

Peng *et al.* (2012) observaram que a BoNT/DC (também conhecida como BoNT/D South Africa) requer *syntaxin* I e II (Syt-I/II) como seu receptor de proteína e identificou a área aproximada de interação com o receptor. Este é o primeiro caso de uma toxina em mosaico que usa um receptor diferente da sua toxina parental. Berntsson *et al.* (2013) estudaram a estrutura cristalina de BoNT/DC-HC no complexo com os domínios de reconhecimento Syt-I e Syt-II, e revelaram que BoNT/DC possui um sítio de ligação ao receptor de proteína, distinto do sítio de ligação de Syt-II estabelecido para BoNT/B. A análise mutacional verificou a importância das interações hidrofóbicas na ligação do receptor. As estruturas sugerem que os locais de ligação da BoNT/DC ao gangliosídeo são independentes do local de ligação ao receptor protéico e que o BoNT/DC poderia ligar-se a três receptores na membrana neuronal.

Visto que os sorotipos C e D apresentam padrões de mosaico específicos, um problema tem sido a comercialização do sorotipo C/D como sorotipo C e do sorotipo D/C como sorotipo D. Webb *et al.* (2007) identificaram, por meio de sequenciamento genômico, discrepâncias na identificação dos subtipos BoNT D/C VPI 5995 (Metabiologics), e C/D 003-9 (Wako). Anteriormente, estes subtipos foram determinados como sendo sorotipos D e C, respectivamente, apenas com informação imunológica; e como existe alguma reatividade

cruzada, mesmo entre o sorotipo C1 e o sorotipo D, isso acabou levando a uma confusão quanto à sua verdadeira identidade.

Essa natureza antigênica dupla das BoNT C e D traz desafios ao desenvolvimento de tratamentos profiláticos, incluindo vacinas de subunidade Hc recombinante. Além disso, as toxinas do mosaico D/C apresentam um problema ainda mais particular, devido à variação da sequência de aminoácidos na porção Hc, que diverge significativamente de qualquer uma das BoNT parentais (Webb *et al.*, 2007).

3.3.6 Análises por PCR

A maioria dos trabalhos publicados envolvendo a detecção dos genes tipo C (*bont/C*) e tipo D (*bont/D*) por PCR convencional (Prevot *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2005; Takeshi *et al.*, 1996) e por PCR em tempo real (Hill *et al.*, 2010; Kouguchi *et al.*, 2006), não permitiram a distinção de seus mosaicos.

Estudos mais recentes descreveram estratégias que permitiram a tipificação de *Clostridium botulinum* C e D e seus mosaicos. Woudstra *et al.* (2012) desenvolveram dois discos de varredura de genes (*GeneDisc arrays*) para a detecção simultânea de *Clostridium botulinum* tipos C e D e os mosaicos C/D e D/C. Os discos (GD1 C&D e GD2 C,D&mosaic), baseados em PCR em tempo real, usaram pares de iniciadores (*primer pairs*) e sondas (*probes*) desenhados usando as sequências dos genes *bont/C*, *bont/C-D*, *bont/D*, e *bont/D-C*.

O disco GD1 C&D contém o conjunto de *primer* e *probe* C-I, C-II, D-I, e D-II desenhados para as sequências codificantes das cadeias leves (isto é, a porção N-terminal) da BoNT/C e BoNT/D, respectivamente. Esses oligonucleotídeos permitiram a detecção de *Clostridium botulinum* tipo C e D e dos genes *bont* dos tipos mosaicos C/D e D/C, respectivamente, mas sem a possibilidade de diferenciação entre os tipos não-mosaicos e mosaicos. O disco GD2 C,D&mosaic contém o conjunto de *primer* e *probe* C-II (que tem como alvo a cadeia leve da BoNT/C), C-III (que tem como alvo a cadeia pesada da BoNT/C), D-C (que tem como alvo especificamente o mosaico D/C), D-II (que tem como alvo a cadeia leve da BoNT/D), e D-III (que tem como alvo a cadeia pesada da BoNT/D). Esses oligonucleotídeos (Figura 7) foram desenhados para atingir as partes N-terminal e C-terminal dos genes *bont/C* e *bont/D*, permitindo a detecção e identificação específica de tipos não-mosaicos e tipos mosaicos. Os discos GD1 e GD2 mostraram ser ferramentas alternativas confiáveis para detecção e tipificação molecular dos genes das neurotoxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D e seus mosaicos C/D e D/C.

Woudstra *et al.* (2015) também desenvolveram métodos por PCR em tempo real para tipificação genotípica de *Clostridium botulinum* do grupo III, com foco no novo grupo *Clostridium novyi sensu lato*, no gene *ntnh*, genes codificantes de BoNT – *bont/C*, *bont/C/D*, *bont/D*, e *bont/D/C*; e no gene de flagelina (*fliC*). A diversidade genética do *fliC* entre as estirpes de *Clostridium botulinum* do grupo III, neste estudo, resultou na definição de cinco grandes subgrupos identificados de *fliC*-I a *fliC*-V. *fliC*-I a *fliC*-III são geneticamente relacionados (87 a 92% de identidade na sequência), enquanto *fliC*-IV do *Clostridium botulinum* tipo D/C é geneticamente mais distante dos outros tipos de *fliC* (com apenas 50% de identidade na sequência). A combinação de métodos de PCR apresentados neste estudo, permitiu uma melhor caracterização do *Clostridium botulinum* do grupo III e mostrou que o grupo é geneticamente menos diverso que os grupos I e II de *Clostridium botulinum*.

A caracterização de estirpes envolvidas em surtos (Woudstra *et al.*, 2015) por métodos de detecção molecular rápida (Woudstra *et al.*, 2012) revelaram uma similaridade genética marcante no grupo. Portanto, o nível de discriminação promovida por estas técnicas pode ser insuficiente para diferenciar estirpes geneticamente muito próximas. Com o advento das

tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), a investigação de genomas completos de *Clostridium botulinum* tem fornecido informações genéticas relevantes que podem ser usadas em investigações epidemiológicas.

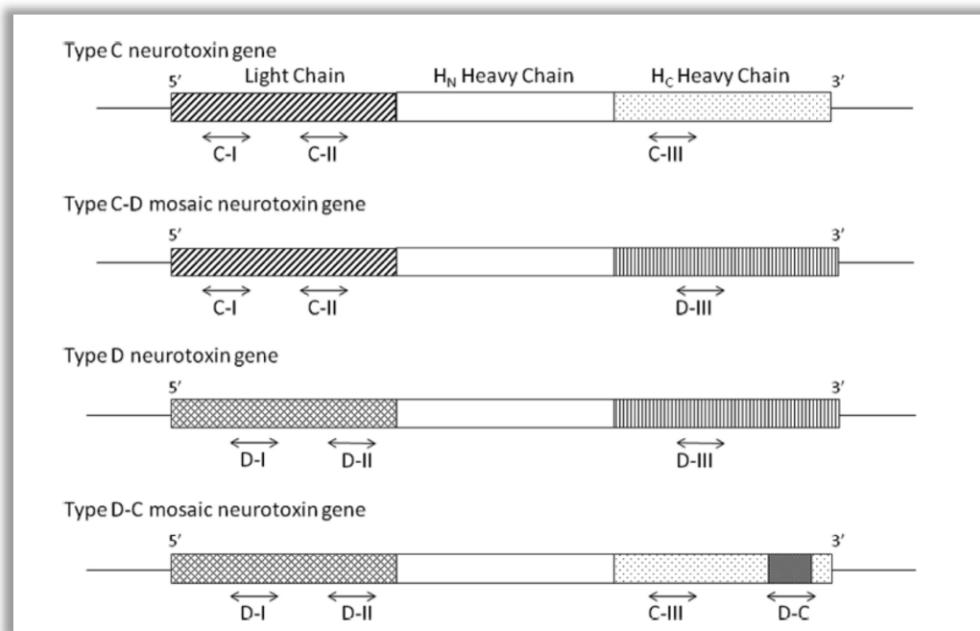


Figura 7 – Representação de domínios homólogos e não homólogos no gene da BoNT em *Clostridium botulinum* tipos C, C/D, D e D/C, e posição dos oligonucleotídeos utilizadas na PCR em tempo real descrita por Woudstra *et al.* (2012)

Extraído de: Woudstra *et al.*, 2012

Nota:

* Domínios altamente homólogos são representados com o mesmo padrão

3.3.7 Análises por sequenciamentos de nova geração

Skarin e Segerman (2011) publicaram o genoma completo de uma estirpe de *Clostridium botulinum* do Grupo III, BKT015925 (tipo C/D). Seu genoma consiste de um cromossoma circular e cinco plasmídeos circulares, todos com um baixo conteúdo G+C de 26-28%. Uma imagem esquemática de quatro dos cinco plasmídeos está apresentada na Figura 8.

O genoma da estirpe BKT015925 de 3,2 Mbp é menor em comparação aos genomas do Grupo I e Grupo II, que têm entre 3,6 e 4,4 Mbp. Além disso, verificou-se que o número de plasmídeos em BKT015925 era muito mais elevado do que nos outros dois grupos de *Clostridium botulinum*, onde nenhuma estirpe foi caracterizada com mais de dois plasmídeos. Os cinco plasmídeos em BKT015925 foram nomeados com prefixos designados de p1-p5 em ordem decrescente de tamanho. Apenas p2BKT015925 e p3BKT015925 foram considerados plasmídeos regulares, enquanto os três restantes foram considerados como fagos devido à presença de genes que se previa estarem associados a funções de fagos. No entanto, estas sequências de fagos eram circulares e continham também genes envolvidos na replicação e/ou partição do plasmídeo, assim pareciam ser pró-fagos propagando-se como plasmídeos.

Em todas as estirpes analisadas por Skarin e Segerman (2011), o *cluster* do gene *bont* estava presente em um grande plasmídeo pró-fago. Muitos dos outros plasmídeos também continham genes de toxina e genes codificadores de outros potenciais fatores de virulência ou de

resistência. Além do *cluster* do gene *bont*, havia genes que codificam para as toxinas C2 e C3, uma alfa-toxina, uma endopeptidase cisteína (*clostripain*) e duas toxinas épsilon localizadas em sequência (Skarin; Segerman, 2011).

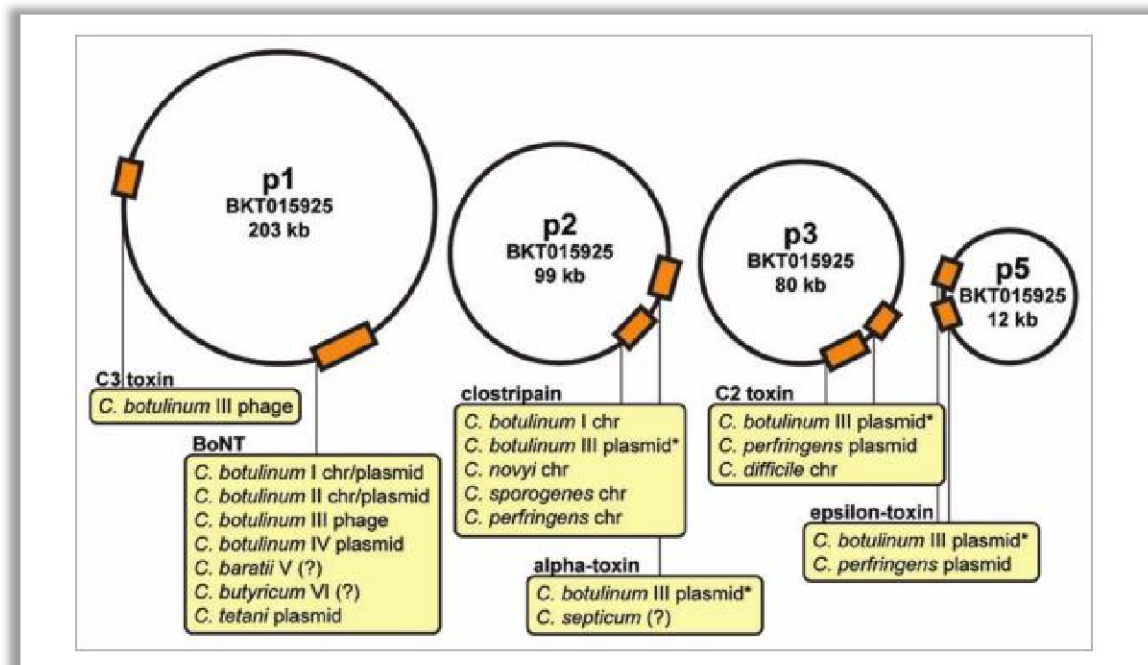


Figura 8 - Genes toxigênicos no plasmidoma da estirpe BKT015925 (tipo C/D), em comparação com a localização do gene (cromossomo (chr), plasmídeo ou fago), em diferentes grupos de *Clostridium botulinum* e em outras espécies de *Clostridium*.

Extraído de: Skarin; Segerman (2011)

Nota:

O título de cada caixa de texto significa a toxina codificada

A toxina C2 consiste em duas subunidades, e, portanto, é codificada por dois genes

*Localizado em diferentes plasmídeos dentro do grupo III de *Clostridium botulinum*

Outra descoberta no genoma do grupo III de *Clostridium botulinum* foi uma abundância de sequências de inserção (IS). Cinco diferentes IS (ISCbo1-5) foram encontradas em um grande número de cópias e em diferentes posições em estirpes estreitamente relacionadas, indicando que elas estão se realocando ativamente. Todos esses elementos móveis representam 3,4% do cromossomo BKT015925, e estão localizados nos três maiores plasmídeos. Oito IS adicionais de realocação, IsCbo7-13, foram identificadas nos dois maiores plasmídeos, mas elas pareciam ser menos ativas. Uma densidade maior de IS foi encontrada nos dois plasmídeos regulares (p2BKT015925 e p3BKT015925) do que nos considerados fagos. Geralmente, os *transposons* são considerados como uma desvantagem para a funcionalidade do fago. No entanto, apenas uma IS (ISCbo1) foi localizada próxima ao *cluster bont* em um dos genomas do grupo III. A ausência de traços de IS no *cluster bont* em estirpes do Grupo III de *Clostridium botulinum*, em combinação com o menor tamanho do genoma poderia indicar uma pressão mais elevada para remover o DNA não essencial (Skarin, 2015).

Skarin *et al.* (2011) também encontraram elementos móveis abundantes dentro do plasmidoma, onde os plasmídeos de tamanho médio tinham a maior densidade de *transposons*, podendo ter contribuído para o mecanismo de rearranjos. Curiosamente, cinco dos seis tipos de toxina encontrados no genoma do grupo III de *Clostridium botulinum* estavam localizados no

plasmidoma. Os pesquisadores sugeriram um modelo para a evolução do genoma onde um núcleo conservado está localizado no cromossomo, enquanto fatores que afetam a patogenicidade estão localizados em um plasmídeo mais plástico, para permitir uma adaptação ambiental mais rápida, sem perturbar as funções centrais.

Segundo estudos realizados por Skarin (2015), o grupo III de *Clostridium botulinum* pode ser dividido em apenas alguns grupos genômicos contendo estirpes de origens muito diversas. Woudstra *et al.* (2016) caracterizaram dezessete isolados de *Clostridium botulinum* do grupo III tipos C/D e D/C *in silico* usando dados de sequenciamento completo do genoma. As análises confirmaram a similaridade marcante entre as estirpes investigadas e as sequências genômicas disponíveis publicamente originadas da Europa. Foi possível discriminar o tipo C/D do tipo D/C, mas nenhuma correlação foi observada entre a origem geográfica e a fonte das estirpes. Por outro lado, neste trabalho ficou demonstrado que análises abrangentes de fago, plasmídeo, CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) e conteúdo SNP (*Single nucleotide polymorphism*) revelaram diferenças significativas entre as estirpes de *Clostridium botulinum* do grupo III, mostrando plasticidade tanto no cromossoma quanto nos elementos móveis destas estirpes. Usando a filogenia SNP core foi possível atingir o mais profundo nível de caracterização, agrupando as estirpes pelas origens dos surtos. Os autores sugerem que agora sequenciamentos de isolados de outros países sejam realizados para identificar SNPs discriminantes, que possam ser usados para análise rotineiras de tipificação genotípica.

3.3.8 A genoespécie *Clostridium novyi sensu lato*

As definições das três espécies *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* e *Clostridium haemolyticum* são estabelecidas com base na toxina que produzem: a BoNT de *Clostridium botulinum* grupo III, a alfa-toxina de *Clostridium novyi* tipo A e B, e a toxina beta de *Clostridium novyi* tipo B e *Clostridium haemolyticum*. No entanto, mesmo antes da revolução de sequenciamento, já se sugeria, com base na hibridização DNA-DNA e características biológicas, que estas espécies estavam estreitamente relacionadas. Johnson e Francis (1975) determinaram que o conteúdo G+C do DNA do *Clostridium novyi* tipo B e do *Clostridium haemolyticum* não diferiam (26 %), mas *Clostridium novyi* tipo C e *Clostridium novyi* tipo A tinham conteúdos G+C de 27 e 29 %, respectivamente. A descoberta de Eklund *et al.* (1974) de que os fagos de *Clostridium novyi* tipo A foram capazes de infectar estirpes de *Clostridium botulinum* tipo C, convertendo-as fenotipicamente em *Clostridium novyi* também contribuiu para esta suposição de proximidade entre estas espécies.

Estudos desenvolvidos por Sasaki *et al.* (2001) determinaram as sequências parciais (1465 pb) do 16S rDNA de *Clostridium novyi* tipos A, B e C e *Clostridium haemolyticum* (Figura 9). Foi demonstrado que *Clostridium novyi* tipos A, B e C e *Clostridium haemolyticum* se agrupam com *Clostridium botulinum* tipos C e D. Particularmente, *Clostridium novyi* tipos B e C e *Clostridium haemolyticum* formam um grupo geneticamente homólogo. Eles exibem ainda uma similaridade maior com *Clostridium botulinum* tipos D (99,4%) e C (99,1%) do que com *Clostridium novyi* tipo A (98,5%).

No entanto, *Clostridium novyi* tipos B e C e *Clostridium haemolyticum* podem ser uma espécie independente, gerada da mesma origem filogenética, uma vez que a doença causada por cada bactéria pode ser determinada pela infecção com bacteriófagos relacionados com a toxina. As sequências de 16S rDNA do *Clostridium novyi* tipo B e *Clostridium haemolyticum* foram idênticas e essas sequências exibiram uma similaridade maior com aquelas do *Clostridium botulinum* tipos D e C do que com aquela do *Clostridium novyi* tipo A (Skarin, 2015; Sasaki *et al.*, 2001).

Diante disso, veio à tona, uma discussão sobre a taxonomia destas bactérias, que pelos estudos atuais, entra em conflito com um conceito filogenético da espécie. Se por um lado, seria impraticável, por razões clínicas, mudar o nome da espécie dos grupos fisiológicos, onde todos os constituintes estão causando botulismo. Por outro lado, seria confuso incluir estirpes que possam causar doenças completamente diferentes dentro da espécie do grupo III. Portanto, foi sugerido por Skarin *et al.* (2011) a classificação do *Clostridium botulinum* grupo III como uma espécie dupla. A espécie patogênica (*pathospecies*) *Clostridium botulinum* incluiria todas as estirpes causadoras de botulismo, enquanto a espécie genotípica (*genospecies*) *Clostridium novyi sensu lato* incluiria *Clostridium botulinum* grupo III, *Clostridium novyi* e *Clostridium haemolyticum*.

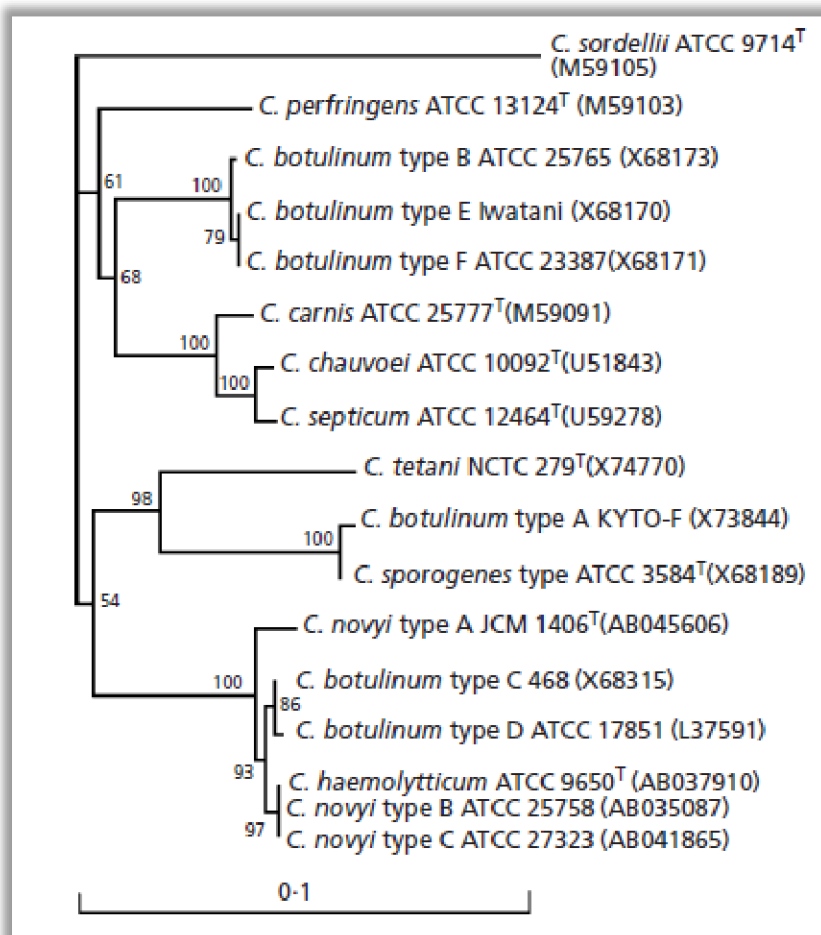


Figura 9 - Relações filogenéticas de *Clostridium novyi* tipos A, B e C e *Clostridium haemolyticum* com outros clostrídios baseados em sequências de 16S rDNA

Extraído de: Sasaki *et al.*, 2001

Notas:

As sequências de 16S rDNA foram trimadas, o que resultou em fragmentos entre as posições 28 a 1410 (*E. coli* numbering)

Os números de acesso das sequências dos organismos estão apresentados entre parêntesis

Valores de *Bootstrap* expressos como percentagens de 1000 replicatas são mostradas nos pontos de ramificação

Bar, 0-1 (distância evolutiva)

3.4 O botulismo

As BoNT são responsáveis no homem e nos animais por uma enfermidade conhecida como botulismo. São reconhecidas cinco formas de botulismo: o botulismo alimentar, intoxicação por ingestão de alimentos contaminados com BoNT; botulismo de ferida, contaminação de uma ferida por esporos de *Clostridium botulinum*, que germinam e produzem BoNT; botulismo infantil e toxemia intestinal do adulto, ingestão de esporos de *Clostridium botulinum*. *Clostridium baratii* e *Clostridium butyricum* e de outras espécies de clostrídios, que entram no intestino, germinam e produzem BoNT; e botulismo iatrogênico, intoxicação por overdose de injeção de BoNT em aplicações cosméticas ou médicas (Sundeen, Barbieri, 2017).

Estas neurotoxinas afetam especificamente vertebrados, sendo os sorotipos A, B e E os mais frequentemente associados ao botulismo humano, com poucos casos sendo causados pelo sorotipo F. Na veterinária, o botulismo é frequentemente uma intoxicação de origem alimentar causada pela ingestão de BoNT pré-formada. Nos animais, o botulismo é essencialmente causado pelas toxinas C e D e mais raramente, pelas toxinas A, B e E. O sorotipo E está mais frequentemente associado com botulismo em vertebrados marinhos e aves que se alimentam de peixes. (Montecucco; Rasotto, 2015)

Os bovinos são susceptíveis aos tipos C e D, raramente acometidos pelos tipos A e B, apresentando quadros agudos ou subagudos. O período de incubação pode variar de poucas horas até uma semana, e a intoxicação depende da dose ingerida pelo animal. Além dos bovinos, outros animais domésticos também são acometidos pelo botulismo causado pelos tipos C e D. Existem relatos no Brasil de surtos com altas taxas de mortalidade em pequenos ruminantes (Lobato *et al.*, 2007) e em aves, como frangos, gansos e perus (Alves *et al.*, 2013; Lobato *et al.*, 2008); assim como casos em cães e animais selvagens (Oliveira Júnior *et al.*, 2016).

Os sinais clínicos iniciais são dificuldade de locomoção, falta de coordenação dos membros posteriores, com progressão cranial da paralisia flácida e psiquismo inalterado. O animal entra em estado pré-agônico, sendo que a morte, precedida por coma, ocorre devido à parada cardiorrespiratória. Lesões à necropsia são raras e limitadas à petéquias no miocárdio como consequência da agonia respiratória, que precede o óbito (Lobato *et al.*, 2007).

O botulismo bovino é normalmente associado a surtos que acometem grande número de animais, com elevada taxa de mortalidade, e que geram grandes prejuízos aos produtores e à cadeia produtiva. O primeiro caso de botulismo em bovinos no Brasil foi descrito por Tokarnia *et al.* (1970), no Estado do Piauí. No período entre as décadas de 1970 e de 1990, os casos aumentaram exponencialmente, principalmente devido ao aumento dos rebanhos de alto rendimento, com animais de alta exigência nutricional, porém com acesso a pastagens pobres em fósforo e cálcio, e sem suplementação mineral adequada, levando-os a desenvolverem hábitos de osteofagia (ingestão de ossos) ou sarcófagia (ingestão de cadáveres) (Silva *et al.*, 2016).

A identificação do botulismo, implementação do seu diagnóstico e difusão de medidas profiláticas foram essenciais para a redução gradual dos casos no país. Embora tenha havido uma mudança epidemiológica considerável, o botulismo permanece como uma importante doença em ruminantes no Brasil, ocorrendo principalmente na forma de surtos esporádicos. Nesses surtos, as BoNTs ingeridas pelos animais têm origem em alimentos contaminados com matéria orgânica em decomposição, tais como fenos, grãos, rações e silagens de má qualidade ou mal armazenados. Além destes, cochos de água com carcaças de pequenos animais ou outros tipos de matéria orgânica em decomposição, bem como poços e lagoas com água estagnada podem servir como fonte de BoNTs para os animais (Lobato *et al.*, 2013).

Dutra *et al.* (2001) demonstraram uma morbidade média de 31% e mortalidade média de 20% em sete surtos de botulismo relacionados ao consumo de água ocorridos nos estados de

São Paulo e Mato Grosso do Sul entre os anos de 1988 e 1993. Estudos posteriores de Dutra *et al.* (2005) demonstraram que, de sete surtos de botulismo ocorridos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, entre 1989 e 2000, relacionados ao consumo de cama de frango, a morbidade média foi superior a 31% e a taxa de letalidade superou 94%, chegando a inviabilizar a produção em muitas das propriedades.

Mais recentemente, foram descritos casos em propriedades do Nordeste, principalmente devido à falta de suplementação mineral e/ou ausência de vacinação contra o botulismo e também no Centro-Oeste brasileiro (Silva *et al.*, 2016). No surto ocorrido em agosto de 2017 no Mato Grosso do Sul, um total de 1100 bovinos foram afetados; a taxa de morbidade foi de 64,7% e a de letalidade de 99,1% (Guizelini *et al.*, 2019).

3.4.1 Diagnóstico

Em medicina veterinária, o diagnóstico presuntivo de botulismo é baseado no histórico e nos sinais clínicos, tais como: posição anormal da cabeça, fraqueza, perda do tônus lingual, e, principalmente, paralisia flácida do trem posterior. Entretanto, o diagnóstico laboratorial é essencial para confirmação da doença, além de permitir a determinação do sorotipo da neurotoxina envolvida.

Durante investigações de botulismo, laboratórios testam em amostras clínicas (por exemplo, soro, fezes, conteúdo gástrico) e/ou em fontes de alimento suspeito, a presença da BoNT ou de estirpes de clostrídios que produzem BoNTs.

Dois fatores são essenciais para aumentar o valor preditivo do diagnóstico de botulismo na veterinária: amostragem de animais com maior probabilidade de detecção de toxina e coleta adequada de espécimes clínicos. Sobre o primeiro ponto, é importante escolher animais que apresentem tempos de incubação mais curtos e que estejam na fase mais aguda da doença, indicando maior ingestão de toxina botulínica (Silva *et al.*, 2016; Oliveira Júnior *et al.*, 2016).

Amostras clínicas para detecção de toxina botulínica devem ser enviadas ao laboratório sob refrigeração, consistindo de pelo menos 2mL de soro sanguíneo, 100g de fragmentos hepáticos, 50g de conteúdo duodenal e abomaso. Quando forem enviados conteúdo estomacal e intestinal, estes devem ser enviados em frascos e não dentro dos órgãos, o que poderia aumentar a chance de resultados falso-negativos, visto que proteases podem degradar as toxinas. Alimentos e água suspeitos de serem fontes de intoxicação também podem ser enviados para detecção de toxinas sob refrigeração (Silva *et al.*, 2016; Lobato *et al.*, 2007).

3.4.2 Métodos de determinação de toxina botulínica

O bioensaio em camundongos é considerado o método “padrão ouro” pela possibilidade de avaliar a funcionalidade de todas as atividades das toxinas botulínicas (ex: ligação, translocação e proteólise), e detectar os oito sorotipos de BoNT (Gimenez; Gimenez, 1995; Singh *et al.*, 2013).

O teste é baseado em uma injeção intraperitoneal ou endovenosa em camundongos de laboratório de amostras diluídas em tampão fosfato ou solventes similares. Se a amostra contiver toxina, os camundongos desenvolvem sinais típicos de botulismo, incluindo pêlos difusos, fraqueza muscular e insuficiência respiratória que se manifesta como uma cintura estreita semelhante a uma vespa. Esses sintomas geralmente se desenvolvem dentro de um dia pós-injeção, mas podem levar até quatro dias para aparecer (Lindstrom; Korkeala, 2006).

Em laboratórios clínicos de microbiologia, o ensaio tem sido usado com amostras fecais, séricas, gástricas, de feridas e alimentos, bem como sobrenadantes de culturas

bacterianas. A toxina botulínica também pode ser pesquisada em amostras de conteúdo ruminal e intestinal, fígado e soro.

O tipo de toxina é determinado pela neutralização da toxina com antitoxinas específicas. Resumidamente, camundongos injetados com a antitoxina neutralizadora sobrevivem, enquanto os outros desenvolvem botulismo. O método pode ser usado para identificar qualquer um dos sete tipos de toxinas. No diagnóstico de botulismo animal, normalmente utilizam-se antitoxinas botulínicas dos tipos C e D como padrões de referência, diluídas para conter 10 UI/mL, em volume suficiente para o teste.

O bioensaio em camundongos é aceito por agências reguladoras farmacêuticas em todo o mundo, além de ser implementado em procedimentos operacionais padrão como o DIN10102 alemão e Métodos Oficiais de Análise da AOAC Internacional (Bigalke; Rummel, 2015). É um método muito sensível, com uma DL_{50} correspondente a 5 a 10 pg e o limite de detecção é de 0,01 ng/ml do eluato da amostra (Lindstrom; Korkeala, 2006).

Apesar da reconhecida sensibilidade e confiança, este método apresenta muitas desvantagens: é demorado (3-4 dias), em parte impreciso, relativamente caro (por requerer grande número de animais) e, mais importante, muitos camundongos sofrem de botulismo e morrem dolorosamente por insuficiência respiratória devido à paralisia flácida dos músculos do diafragma. A morte dos camundongos, também pode ser causada por uma ampla gama de outros efeitos sistêmicos, ou seja, pneumonia ou insuficiência cardíaca, gerando especificidade e precisão limitadas do método (Bigalke; Rummel, 2015; Wood, 1991).

O uso de animais para esse tipo de determinação tem causado inúmeras discussões éticas por grupos humanitários e pesquisadores que visam o bem-estar animal, tornando necessários estudos visando à redução ou até mesmo a eliminação do emprego de animais para pesquisa e diagnóstico (Salvarani *et al.*, 2010). Nesse sentido, uma variedade de testes *in vitro* para a detecção de neurotoxinas botulínicas têm sido relatados (Lindstrom; Korkeala, 2006; Pellett, 2013).

O ELISA é de longe o formato de imunoensaio mais comumente aplicado na detecção de neurotoxinas botulínicas. A sensibilidade dos ELISAs convencionais para detecção de neurotoxina botulínica é cerca de 10 a 100 vezes inferior à do bioensaio em camundongos. Comparado com o bioensaio, os imunoensaios são tecnicamente mais simples e rápidos de realizar e interpretar. Porém desvantagens estão associadas a indisponibilidade de anticorpos de alta qualidade; possibilidade de resultados falso-positivos (decorrentes de detecção tanto de neurotoxinas biologicamente ativas quanto de toxinas inativas), e de resultados falso-negativos (decorrentes de variação genética dentro dos diferentes sorotipos da neurotoxina, causando diminuição da afinidade aos anticorpos monoclonais) (Thirunavukkarasu *et al.*, 2018; Lindstrom; Korkeala, 2006).

Outro caminho para detectar e identificar BoNTs é determinar a atividade catalítica do domínio da endopeptidase. Os ensaios de endopeptidase baseiam-se na clivagem específica de proteínas sintéticas (proteínas do complexo SNARE) por diferentes neurotoxinas botulínicas, combinadas com a detecção imunológica do peptídeo clivado, ou detecção da fluorescência liberada quando o peptídeo marcado com um cromóforo é clivado. Os testes Endopep-MS recentemente desenvolvidos determinam os produtos da clivagem do substrato, por espectrometria de massa, sendo um método rápido e robusto para detectar e diferenciar os diferentes sorotipos de BoNT. Esse método também foi considerado compatível com matrizes como soro e alimentos (Thirunavukkarasu *et al.*, 2018; Lindstrom; Korkeala, 2006).

Kalb *et al.* (2015) desenvolveram um formato de Endopep-MS que inclui uma etapa adicional de imunoafinidade, usando esferas revestidas com anticorpos monoclonais de alta afinidade e sorotipo específicos que podem se ligar à cadeia pesada de diferentes BoNT,

permitindo que o ensaio atinja um limite de detecção semelhante ou até superior ao do bioensaio.

Os ensaios de endopeptidase têm potencial para substituir o bioensaio em camundongos, uma vez que detectam apenas neurotoxina biologicamente ativa e são geralmente mais sensíveis. No entanto, devido à exigência de equipamento dispendioso e de competências especializadas, a técnica não é adequada para todos os laboratórios (Lindstrom; Korkeala, 2006).

Outros ensaios alternativos que poderiam substituir o bioensaio incluem linhas celulares neurogênicas e ensaios *in vitro* baseados em células-tronco que podem detectar a atividade biológica das BoNTs (Pellett, 2013). No entanto, esses testes estão sujeitos a restrições técnicas e operacionais, incluindo a necessidade de células neuronais humanas ou de ratos, derivadas de células-tronco embrionárias pluripotentes ou induzidas (Thirunavukkarasu et al., 2018).

O risco potencial do uso de neurotoxinas botulínicas (BoNTs) como armas biológicas, a intoxicação acidental por alimentos e suas crescentes aplicações como drogas terapêuticas no tratamento de muitos distúrbios neurológicos e não neurológicos requerem métodos sensíveis para a detecção e medição de quantidades mínimas (Bigalke; Rummel, 2015).

A escolha do método deve levar em conta, os diferentes propósitos e exigências das medições. Alguns métodos detectam simplesmente a presença da proteína em sua forma ativa ou inativa. Outros métodos só detectam a BoNT ativa, independente de sua estrutura primária (métodos funcionais). A título de exemplo, métodos não funcionais não deveriam ser escolhidos para analisar BoNTs fabricadas para fins terapêuticos, pois não são apropriados para comprovar atividade biológica, estabilidade e qualidade do fármaco, visto que todas as etapas que levam ao bloqueio da fusão de vesículas em células nervosas são essenciais para a atividade e devem ser cobertas pelo teste. Portanto, um método usado para controle de qualidade deve testar a função de cada domínio da neurotoxina (ligação, translocação, liberação do domínio enzimático e sua atividade catalítica) em um ensaio ou em um conjunto de ensaios (Bigalke; Rummel, 2015; Rossetto *et al.*, 2014).

O bioensaio em camundongos ainda representa o método mais utilizado para detecção de BoNT em matrizes complexas, bem como para sua quantificação precisa. No entanto, é notória a necessidade da aceitação de métodos alternativos para quantificação de BoNT, e isso certamente exigirá materiais de referência certificados adequados com atividade biológica específica definida. Esses materiais de referência devem ser úteis para avanços na garantia de qualidade em todos os diferentes setores da pesquisa, saúde, alimentação e segurança, bem como nas indústrias farmacêuticas.

3.5 Uso de anticorpos (antitoxinas)

A intervenção terapêutica recomendada para o botulismo consiste principalmente em ventilação de suporte, para casos onde for observado desconforto respiratório, e administração de imunoglobulinas anti-BoNT (antitoxinas botulínicas).

Acredita-se que o benefício clínico da administração de antitoxinas botulínicas em casos clínicos de botulismo, seja devido à eliminação da toxina circulante que reduz a progressão e a gravidade da doença. No entanto, a administração eficaz de antitoxina é limitada a uma janela de oportunidade relativamente estreita e deve ser administrada dentro de 24 horas após o início dos sintomas (Webb; Smith, 2013).

Em se tratando de botulismo bovino, essa terapia ainda é muito pouco aplicada pois os animais são extremamente sensíveis à toxina botulínica o que traz uma evolução muito rápida da doença; muitas vezes um grande número de animais do mesmo rebanho é acometido; e ainda é um tratamento difícil de ser colocado em prática em propriedades de grande extensão

territorial. Nesses casos, em geral, a eutanásia acaba sendo aplicada (Silva *et al.*, 2016). Apesar do custo e das limitações mencionadas, houve sucesso com a aplicação da terapia em bovinos acometidos no surto ocorrido no Centro-Oeste do Brasil, em agosto de 2017, com redução da mortalidade e aceleração de sua recuperação (Guizelini *et al.*, 2019).

Em geral, as preparações de antitoxina são feitas em animais, preferencialmente cavalos, que podem fornecer grandes volumes de plasma de elevado título, o que favorece a produção comercial de antitoxinas em larga escala. Cada animal recebe uma série de injeções de toxóide, suficiente para estabelecer uma resposta imune com altos títulos de anticorpos. O toxóide utilizado na imunização é monovalente, de forma que cada animal possa produzir antitoxina apenas para um determinado sorotipo botulínico. Historicamente, os toxóides são produzidos por inativação das toxinas botulínicas com formalina. No entanto, outros métodos para inativar toxinas, como o uso de reagentes de ligação cruzada, como glutaraldeído, pH extremo ou temperaturas elevadas, também podem ser usados. Mais recentemente, derivados recombinantes ou quimicamente alterados das toxinas foram relatados (Byrne; Smith, 2000).

Mattoo e Keller (2012) descreveram um histórico do desenvolvimento de adjuvantes para administração conjunta com toxóides. Ramon foi o primeiro a fornecer informações indicando que a inflamação causada pela co-administração de vários produtos químicos, como óleos e extratos de tapioca, facilitou a produção elevada de anticorpos em equinos. Glenny foi o primeiro a co-administrar sais de alumínio com antígeno e Freund posteriormente desenvolveu emulsões de óleo contendo *Mycobacterium tuberculosis* inativada para aumentar a resposta imunológica. Estudos também examinaram o efeito de combinações de adjuvantes de Al(OH)₃ e emulsão de óleo quando ovelhas foram hiperimunizadas. Yu *et al.* (2010) utilizaram o adjuvante incompleto de Freund para imunizar cavalos com um antígeno botulínico recombinante.

A antitoxina obtida a partir de cada animal pode ser purificada e depois combinada de uma maneira controlada, com base na potência de cada sorotipo, para criar uma composição polivalente de antitoxinas botulínicas.

3.5.1 Uso no diagnóstico e identificação do tipo de toxina

Os anticorpos contra as toxinas botulínicas são também utilizados como reagentes de diagnóstico para classificar sorotipos de toxina.

O material para os primeiros padrões de antitoxina botulínica reconhecidos foi originalmente produzido no *Microbiological Research Establishment*, em Porton Down (Reino Unido) contra *Clostridium botulinum* tipos A-E e estes serviram como preparações de referência britânicas entre 1954 e 1960. As antitoxinas foram produzidas por imunização de equinos com doses gradualmente crescentes de toxóide inativado com formalina/alumínio durante um longo período de tempo, incluindo estimulação primária por quatro semanas, período de descanso de pelo menos dois meses e hiperimunização por pelo menos quatro meses. Como este material foi considerado adequado para um potencial Padrão Internacional da OMS, 100 frascos de cada foram diluídos com água destilada, envasados (1,0 mL/ampola) e liofilizados em 1960 no *National Institute for Medical Research* (Reino Unido), e posteriormente estabelecidos durante o mesmo ano como os primeiros padrões britânicos para antitoxinas tipo A-E (Bowmer, 1963; Jones; Sesardic, 2006).

Conforme descrito no Relatório Técnico da *World Health Organization* (WHO) *Expert Committee on Biological Standardization* (ECBS) (WHO, 1964), as Unidades Internacionais foram definidas pelo *National Institute for Medical Research* (Reino Unido) como a atividade neutralizadora contida em 0,0800 mg do Padrão Internacional para o tipo C (ou 1000 UI/ampola) e 0,0121 mg do Padrão Internacional para o tipo D (ou 1000 UI/ampola). Para os

tipos A a D, as UI originais foram baseadas na capacidade de cada unidade neutralizar aproximadamente 10.000 doses de DL₅₀ intraperitoneal em camundongo.

Em 1989, o WHO ECBS observou que os estoques do Padrão Internacional para antitoxina de *Clostridium botulinum* tipo C estavam muito baixos e que a distribuição teria que ser interrompida. No entanto, o Comitê considerou que, como C, D e F eram importantes para fins de tipificação, deveriam ser mantidos, mas que o Padrão Internacional para a antitoxina tipo C não necessitaria de ser substituído (WHO, 1989). A recente geração ou desenvolvimento de novas antitoxinas policlonais e oligoclonais (uma combinação de vários monoclonais por sorotipo) e vacinas contra todos os sete sorotipos, entretanto, mudou essa perspectiva e destacou a necessidade urgente de antitoxinas substitutas para calibrar os ensaios de potência.

Em 1996, o responsável pela custódia dos estoques remanescentes de padrões internacionais foi alterado do *Statens Serum Institut* (Dinamarca) para o *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, Reino Unido).

Infelizmente, ao longo dos anos, muitos dos outros padrões oficiais de antitoxina da WHO também se esgotaram ou quase se esgotaram, sendo que as antitoxinas dos sorotipos A, C, E e F não estão mais disponíveis para distribuição. Os estoques do sorotipo D também são muito baixos e estão atualmente sendo racionados, mas logo não estarão mais disponíveis para distribuição.

Atualmente, o NIBSC disponibiliza alguns Materiais de Referência de categorias inferiores aos Padrões Internacionais, denominados non-WHO. Dentre eles estão um de Antitoxina botulínica do tipo C e um de Antitoxina botulínica do tipo D, que foram doados ao NIBSC em julho de 1998 pelo *US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick* (EUA). Os materiais foram preparados pela imunização de equínos com toxóides botulínicos, das estirpes C/D 003-9 (para antitoxina C) e da linhagem D CB-16 (para a antitoxina D).

O material de referência de antitoxina botulínica tipo C Non WHO (NIBSC 01/508) é um candidato a substituto da antitoxina botulínica tipo C WHO, 1º padrão internacional (NIBSC 60/002), mas ainda não foi calibrado internacionalmente. Já o material de referência de antitoxina botulínica tipo D Non WHO (NIBSC 01/510), é um candidato a substituto da antitoxina botulínica tipo D WHO 1º padrão internacional (NIBSC 61/001), mas ainda não foi calibrado contra esse último.

É importante que os países façam investimentos nessa área de tecnologia e alcancem uma independência tecnológica em relação à produção de materiais de referência.

3.6 Profilaxia do botulismo em bovinos

Medidas de prevenção como suplementação mineral balanceada; água e ração de boa qualidade; o não uso de cama de frango; cuidados durante o armazenamento e preparo da alimentação animal, a fim de evitar a incorporação de carcaças, principalmente de pássaros ou roedores e disposição adequada de carcaças são de suma importância na prevenção do botulismo em animais (Silva *et al.*, 2016; Lobato *et al.*, 2013). Além dessas práticas, no caso dos bovinos, a principal forma de controle do botulismo consiste na vacinação com a indução de anticorpos neutralizantes contra as BoNT C e D.

A vacinação produz anticorpos neutralizantes que protegem contra as BoNTs por três mecanismos relatados: anticorpos IgA gerados nas superfícies das mucosas evitam a transcitose através dos epitélios do intestino e bloqueiam a entrada na circulação; IgA e IgG se ligam a BoNTs circulantes, marcando-as para serem eliminadas por células fagocitárias do sistema imune; e anticorpos específicos se ligam próximos aos sítios de ligação dos receptores e bloqueiam a interação com o receptor neuronal (Anniballi *et al.*, 2014).

Atualmente, as vacinas veterinárias comerciais são produzidas por inativação de cultivos de *Clostridium botulinum* por formaldeído (toxóides), purificação parcial das BoNT e associação com adjuvante de hidróxido de alumínio, principalmente. Apesar da reconhecida eficácia desse tipo de vacina, e do sucesso do seu uso no controle sanitário do país, existem desvantagens e riscos na produção dos toxóides. Dentre elas pode-se citar: o isolamento e o cultivo em larga escala de estirpes de *Clostridium botulinum*, bem como a purificação e detoxificação da BoNT, que tornam o processo demorado, laborioso e com riscos elevados para a biossegurança. Além disso, o rendimento da BoNT nem sempre é constante entre diferentes lotes, podendo ser relativamente baixo, o que aumenta os custos de produção (Moreira Júnior *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2014)

Nos últimos anos, vacinas recombinantes têm atraído a atenção dos pesquisadores, como promissoras substitutas daquelas compostas por toxóides. Conforme já explicado anteriormente, as BoNTs são compostas por uma cadeia leve (LC, 50 kDa) e uma cadeia pesada (HC, 100 kDa), sendo esta última composta por dois domínios de 50 kDa: o N-terminal de translocação (H_N) e o C-terminal de ligação (H_C). O domínio H_N é o intermediário da internalização da LC, enquanto o domínio H_C é responsável por interagir com os receptores neuronais colinérgicos.

Todos os três domínios da toxina botulínica (LC, H_N, H_C) têm a capacidade de provocar imunidade em modelos animais em diferentes graus. Epítomos conformacionais parecem ser o principal determinante para induzir níveis altos de anticorpos neutralizantes, destacando a importância da resposta de células B na imunidade adaptativa (Smith, 2009).

Dentre essas regiões protéicas mencionadas, o domínio H_C, por sua vez, é o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes, uma vez que essas podem induzir anticorpos capazes de neutralizar a intoxicação (Cunha *et al.*, 2014; Baldwin *et al.*, 2008).

A produção de vacinas recombinantes, quando comparada à produção dos toxóides, tem como vantagem um menor tempo de produção (ex. a produção de bacterinas recombinantes de *E. coli* demora apenas 2 a 3 dias), e não requer muitas precauções de biossegurança, uma vez que as rH_C recombinantes não são tóxicas (Moreira Júnior *et al.*, 2016).

Os antígenos protéicos recombinantes do domínio H_C de BoNT podem ser produzidos em quantidades elevadas usando plataformas de expressão, como leveduras ou *Escherichia coli*; podem ser purificados utilizando-se métodos de cromatografia convencional ou mesmo não necessitando dessa etapa. Formulações recombinantes já foram descritas como estáveis, seguras, e bem toleradas em modelos animais, induzindo imunidade protetora contra desafios significativos utilizando-se neurotoxina ativa, após duas a três vacinações (Moreira *et al.*, 2014; Webb; Smith, 2013; Gil *et al.*, 2013).

Baldwin *et al.* (2008) desenvolveram a primeira vacina recombinante heptavalente de BoNT com o domínio H_C expresso em *E. coli*, que promoveu uma resposta policlonal com ampla neutralização contra BoNTs.

Gil *et al.* (2013) desenvolveram um antígeno quimérico constituído pelo adjuvante LTB (subunidade B da enterotoxina lábil ao calor de *Escherichia coli*) e H_C de BoNTs C e D. Essa preparação foi capaz de produzir índices de anticorpos neutralizantes (5 e 10 UI/mL) contra as BoNTs C and D, respectivamente, em cobaias quando administrada com hidróxido de alumínio como adjuvante. Cunha *et al.* (2014) testaram a mesma vacina em bovinos, e os animais produziram anticorpos neutralizantes contra os sorotipos C e D, com média de 5 e 6,14 UI/mL, respectivamente, sugerindo que esta quimera é efetiva contra o botulismo bovino.

Moreira Júnior *et al.* (2016) avaliou o potencial de proteção de neurotoxinas botulínicas recombinantes dos sorotipos C e D. Nesse estudo, vacinas bivalentes contendo 200 µg rH_C e rH_D foram formuladas de três maneiras diferentes: (1) antígenos purificados; (2) bacterinas de *Escherichia coli* recombinantes; (3) lisados de células de *E. coli* recombinantes. As cobaias imunizadas, por via subcutânea com formulações recombinantes desenvolveram uma resposta

imunológica protetora contra as respectivas BoNTs, conforme determinado por bioensaio em camundongos. Os antígenos recombinantes purificados foram capazes de induzir 13 UI / mL de antitoxina C e 21 UI / mL de antitoxina D. Similarmente, tanto as bacterinas recombinantes quanto as formulações de lisado celular foram capazes de induzir 12 UI / mL de antitoxina C e 20 UI / mL de antitoxina D. Esses valores foram duas vezes mais altos que os valores obtidos com toxóide comercial usado como controle, e de duas a dez vezes mais altos que o mínimo exigido pelo MAPA.

Otaka *et al.* (2017) avaliou a resposta imune humoral de bubalinos vacinados com três diferentes concentrações de proteínas recombinantes (100, 200 e 400 µg) contra os sorotipos C e D de BoNT, bem como comparou os grupos entre si e com um grupo vacinado com um toxóide comercial bivalente. A vacina recombinante com concentração de 400 µg de proteínas induziu os maiores títulos entre as vacinas testadas, tendo alcançado o mínimo exigido pelo MAPA (que é de 5,0 UI/mL para o tipo C e 2,0 UI/mL para o tipo D, conforme Brasil (2002)), e provou ser a melhor escolha entre as formulações avaliadas, podendo ser considerada como uma potencial vacina contra o botulismo em búfalos.

Mesmo com uma vacina de subunidade contra os sete protótipos de sorotipos da BoNT já tendo sido produzida, a presença de variantes de BoNT como subtipos ou mosaicos desafia o desenvolvimento de vacinas e terapias pan-BoNT.

Um exemplo dessa limitação foi evidenciado no trabalho de Webb *et al.* (2007). Vacinas recombinantes produzidas com o domínio H_C de BoNT para os sorotipos C1 e D na levedura *Pichia pastoris* foram testadas em relação à proteção conferida contra quatro subtipos distintos das toxinas BoNTs C e D. Camundongos foram vacinados com rBoNT/C1 H_C, rBoNT/D H_C, ou com uma combinação de ambas e desafiados com as toxinas BoNT C₁ e BoNT D, e com os mosaicos BoNT C/D e BoNT D/C. Os camundongos que receberam vacinas monovalentes foram parcialmente ou completamente protegidos contra a toxina homóloga e não protegidos contra a toxina heteróloga. Já no teste com vacinas bivalentes, os camundongos sobreviveram aos desafios de todas as toxinas, exceto ao da toxina D/C. A análise das estruturas cristalinas do domínio H_C da BoNT/C e H_C da BoNT/D/C reveladas quando as estruturas globais estavam bem alinhadas, identificaram diferenças sutis dentro de segmentos de alça na extremidade C-terminal dos H_C que podem representar epítomos neutralizantes únicos (Karalewitz *et al.*, 2012).

A variabilidade antigênica observada entre os sete sorotipos da BoNT exige uma nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas. Utilizar e ampliar o conhecimento sobre estrutura-função das BoNTs e da sua organização tridimensional para produzir moléculas contendo os epítomos imunodominantes de variantes antigênicas distintas, pode ser o caminho para o *design* racional das vacinas.

3.6.1 Controle oficial de vacinas contra o botulismo

Em países endêmicos para botulismo bovino como Austrália, Brasil, África do Sul e Israel, as vacinas são testadas por órgãos oficiais e em alguns deles, existem programas de vacinação para prevenir a intoxicação aguda e subaguda por *Clostridium botulinum* tipos C e D (Steinman *et al.*, 2006). Na Europa, o teste na espécie-alvo pode ser dispensado desde que o fabricante demonstre a consistência do produto, testes de segurança bem-sucedidos, além da aprovação de 10 lotes consecutivos.

A comercialização de vacinas contra *Clostridium botulinum* C e D no Brasil, começou na década de 1980 e o controle oficial foi implementado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 1997 (Lobato *et al.*, 1998), baseado na técnica utilizada na África do Sul. Atualmente, o controle é realizado pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, e envolvem testes de esterilidade,

inocuidade e potência, sendo esse último realizado por bioensaio em camundongos (Brasil, 2002).

O teste de potência de vacinas contra o botulismo preconiza a vacinação de 12 cobaios pesando entre 350 e 450 g, por via subcutânea, com duas doses de 5,0 mL de vacina, sendo a dose de reforço aplicada 21 dias após a primovacinação. Aos 42 dias da primeira vacinação os cobaios devem ser divididos em dois grupos de pelo menos cinco animais, denominados A e B, e realizada a sangria por punção cardíaca, constituindo-se um *pool* de soro do grupo A, do grupo B e do grupo AB. Os soros obtidos devem ser titulados, quanto ao nível de antitoxina botulínica dos tipos C e D, em unidades internacionais por mililitro (UI/mL), através da inoculação de dois camundongos, com peso entre 18 e 22 gramas, por via endovenosa. Os camundongos devem ser observados durante 72 horas, registrando os resultados a cada 24 horas. Para a vacina ser considerada aprovada, pelo menos um dos *pools* de soros examinados deverá apresentar níveis mínimos de 5,0 UI/mL (para antitoxina C) e de 2,0 UI/mL (para antitoxina D) (Brasil, 2002).

Atualmente, existem cerca de 15 laboratórios produtores de vacinas contra clostridioses sendo, seis deles produtores de vacinas anti-botulínicas, totalizando mais de 100 milhões de doses comercializadas em 2018.

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Informação Pessoal, Anderson Silva Dias, LFDA/MG, 2019), o número de partidas de vacinas anti-botulínicas, testadas e reprovadas nos testes *in vivo*, reduziu significativamente ao longo dos anos. A tabela 1 descreve o número de partidas de vacinas anti-botulínicas, analisadas de 2015 a 2018 e o percentual de partidas reprovadas.

Apesar da existência de uma normativa que estipula títulos mínimos para a aprovação de uma vacina contra o botulismo no Brasil, é necessário enfatizar que o quadro clínico do botulismo é dependente da quantidade de toxina ingerida. Portanto, é desejável que as vacinas utilizadas sejam capazes de induzir o mais alto grau de imunidade pelo período mais longo possível (Otake *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Número de partidas de vacinas anti-botulínicas analisadas por ano pelo MAPA e o percentual de vacinas reprovadas nos testes de potência

Ano	Total Geral		Aprovadas		Reprovadas		
	Partidas	Doses	Partidas	Doses	Partidas	% Rep.	Doses
2015	87	100.617.500	86	98.266.860	1	1,15	2.350.640
2016	116	77.145.363	115	75.194.668	1	0,86	598.500
2017	118	51.070.300	118	43.221.870	0	0,00	0
2018	107	128.215.663	102	126.264.270	5	4,68	3.491.500
Total	428	357.048.826	421	342.947.668	7	1,64	6.440.640

Fonte: Informação pessoal recebida do Auditor Fiscal Federal Agropecuário, Anderson Silva Dias, Responsável Substituto pelo Laboratório de Controle de Produtos Veterinários do LFDA/MG, em 13.03.2019

3.7 Materiais de referência

Materiais de referência (MR) são necessários para a produção e controle de praticamente todos os produtos de uso veterinário, incluindo vacinas. Embora haja grande variação nos tipos de produtos veterinários no mercado, em algum estágio da produção, o uso de soros de referência, antígenos de referência ou outra preparação de referência será quase sempre necessário. Como esses materiais são usados para julgar a consistência da fabricação e o controle de qualidade dos produtos, eles devem ser adequadamente estabelecidos, mantidos e

monitorados. Como dito por Castle (1998), “confiar em um padrão ruim pode dar uma falsa sensação de segurança”.

A demanda por materiais de referência de maior qualidade está crescendo como consequência da exigência de dados mais precisos e exatos em áreas científicas, tecnológicas e na prestação de serviços. Alguns materiais de referência previamente aceitos podem não mais atender a esses requisitos mais rigorosos. Com isso, não é somente necessário que os produtores de material de referência forneçam informações sobre os seus materiais na forma de relatórios, certificados e declarações, mas também que demonstrem a sua competência na produção de materiais de referência com a qualidade apropriada (ABNT, 2012).

Conceitualmente, material de referência (MR) é um material, suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição. Já um material de referência certificado (MRC) é um material de referência, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2016).

A diferença entre ambos é que, enquanto um material de referência (MR) específico pode ser adequado para controle de qualidade, a definição de MRC leva em conta o importante termo rastreabilidade, utilizado para relacionar o resultado de medição a uma referência, permitindo a esse tipo de material, usos variados e simultâneos (Ulrich, 2011).

Sempre que possível, recomenda-se que a medição de um dado valor de propriedade seja realizada através de um método com as características definidas pela validação ou pelo uso de padrões rastreáveis, com a incerteza desprezível em relação aos requisitos da utilização final e por meio de instrumentos de medição, que sejam rastreáveis aos padrões nacionais de medição. A utilização subsequente de um MRC, com propriedades rastreáveis, assegura que a rastreabilidade seja propagada até o usuário. Como os padrões nacionais de medição são em sua maioria harmonizados internacionalmente, convém que os padrões de medição em um país sejam compatíveis com padrões similares em outro país. Em muitos casos, os MRC são apropriados para as intercomparações de padrões nacionais de medição (ABNT, 2012).

A produção e distribuição de um MR requer um planejamento cuidadoso, e muitas vezes, são necessários estudos prévios de viabilidade do projeto. Com o intuito de fornecer uma sistemática para os produtores dos materiais de referência, detalhando requisitos, que abrangem desde condições ambientais para preparação até rotulagem dos frascos, normas e guias foram publicados pela *International Organization for Standardization* (ISO), e alguns destes traduzidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Dentre estes documentos, ABNT ISO 17034 (2017b) “Requisitos gerais para competência de produtores de material de referência” fornece todas as diretrizes e requisitos que devem ser cumpridos pelos produtores, desde a organização da documentação até o planejamento da produção do material de referência, sendo uma das diretrizes mais importantes no processo de produção de um material de referência.

Outro guia igualmente importante é ABNT ISO GUIA 35 (2012) “Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação” que fornece as diretrizes dos tratamentos estatísticos a serem executados com o candidato a material de referência, instruindo sobre as formas possíveis para realização de ensaios de homogeneidade, ensaios de estabilidade e caracterização do material de referência. Esse documento já possui uma nova versão publicada pela ISO mas ainda não traduzida pela ABNT (ISO, 2017).

Uma vez atendidas as especificações descritas em seu certificado e manipulados em ambientes adequados, os MRCs podem ser utilizados em qualquer tipo de laboratório (universidades, indústrias, institutos de pesquisa, prestadores de serviço, dentre outros).

Entretanto, para aqueles laboratórios que desejam operar dentro de um Sistema de Gestão da Qualidade, o seu uso contínuo torna-se uma importante, e imprescindível, ferramenta na implantação e manutenção desse sistema (Ulrich, 2011).

Nos últimos anos várias organizações internacionais desenvolveram materiais de referência certificados a fim de suprir as inúmeras demandas existentes. Existem sistemas de busca que podem ajudar na localização de materiais de referência, como por exemplo, o COMAR (*International database for certified reference materials*).

Muitos materiais de referência, rotineiramente denominados “padrões de referência” também estão disponíveis em instituições públicas, como laboratórios veterinários nacionais. Esses MRs fornecem uma base comum para os métodos de ensaio a serem aplicados pelos fabricantes e autoridades de controle, e desempenham um papel importante na padronização. A Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Farmacopéia Européia também estabeleceram coleções de padrões de referência. Os padrões fornecidos por essas instituições podem ser utilizados por laboratórios nacionais na calibração de seus próprios materiais de referência.

A disponibilidade de materiais de referência, principalmente no Brasil, ainda é incipiente, especialmente na área biológica. Além disso, as dificuldades alfandegárias e custos envolvidos na sua obtenção são fatores inibidores para o acesso e uso destes materiais. Adiciona-se ainda o fato de que algumas instituições que fornecem materiais de referência restringem as quantidades enviadas, a fim de garantir que esse precioso material dure por um período de tempo razoável.

Diante do exposto, é premente a necessidade de aumentar a disponibilidade de materiais de referência em áreas diversas, contribuindo para o desenvolvimento tecnológico do país. Para isso, é necessário aumentar o conhecimento sobre os requisitos a serem atendidos em um projeto de certificação de materiais de referência.

3.7.1 Materiais de referência microbiológicos

Historicamente, a técnica utilizada para a detecção de bactérias em amostras biológicas foi baseada no crescimento bacteriano em meios de cultura específicos, e posterior confirmação por testes bioquímicos e/ou imunológicos das colônias presuntivas. No entanto, nos últimos anos, como forma de superar a baixa sensibilidade e especificidade de métodos microbiológicos, assim como para obter resultados de forma mais rápida, novos métodos foram implementados em laboratórios de diagnóstico, especialmente aqueles baseados em técnicas moleculares e genômicas. No entanto, a disponibilidade e o uso de MR biológicos não expandiram na mesma velocidade que as técnicas. Ainda hoje, existem muitos parâmetros para os quais um MR apropriado não foi desenvolvido. Diante dessa necessidade, o desenvolvimento de processos de produção bem planejados e robustos, além de estratégias bem definidas para caracterização, são essenciais para a ampliação da oferta de novos MRs, adequados ao uso pretendido.

O desenvolvimento de MRs para análises microbiológicas é especialmente desafiador devido às dificuldades encontradas na estabilização e recuperação de células viáveis; dispersão de números precisos de células; efeitos de matriz e; quando para uso em técnicas moleculares, a presença de ácidos nucleicos (ex. DNA) adequados.

Atualmente, uma gama de MRs microbiológicos está disponível comercialmente. A *American Type Culture Collection* (ATCC) é a principal organização global de recursos e padrões de materiais biológicos que oferece uma extensa coleção produzida sob certificação e acreditação ISO. A coleção inclui: linhagens celulares humanas e animais; células-tronco; derivados celulares e microbianos, ferramentas genômicas moleculares, micro-organismos e produtos biológicos. O *National Institute of Standards and Technology* (NIST), *National*

Institutes of Health (NIH) e *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI), todos dos EUA, também produzem MRs para uso em avaliações biológicas.

Laboratórios produtores de MRs estão utilizando diferentes apresentações para seus produtos: leite em pó contaminado, desidratado por pulverização (*spray-dried*), discos plano-convexos secos, *BioBalls* liofilizadas ou semi-sólidos de matriz de amido (Philipp *et al.*, 2007).

A confiabilidade dos MRs depende de propriedades como representatividade, estabilidade e homogeneidade. A representatividade implica em demonstrar que o micro-organismo presente no material possua as mesmas propriedades típicas (por exemplo, bioquímicas) do organismo alvo. Estas propriedades são de grande importância para a identificação do micro-organismo alvo e não podem ser alteradas ou perdidas durante o processo de produção do material de referência (Janning *et al.*, 1995).

Nesse tipo de MR, também deve ser garantida a estabilização, sobrevivência e reativação de organismos viáveis, durante períodos longos de armazenamento. Sabe-se que a viabilidade das células pode ser fortemente afetada, por exemplo por altas temperaturas ou por processos de dessecação que geram muito estresse. Ao longo do processo, uma certa diminuição das células bacterianas é inevitável, mas ela pode ser mantida dentro de limites aceitáveis, controlando-se alguns fatores como: condições de cultivo e condições de armazenamento. Por fim, a qualidade de alguns materiais pode não ser satisfatória devido à homogeneidade insuficiente, o que deve ser contornado na etapa de produção.

Além dos MRs baseados em células viáveis, outro desafio é o desenvolvimento de MRs para métodos moleculares quantitativos e qualitativos em análises microbiológicas, incluindo MRs baseados em ácidos nucleicos, proteínas ou outros alvos moleculares para identificar organismos selecionados ou suas partes. No caso de MRs baseados no DNA genômico, uma das questões iniciais mais importantes é saber como estabilizar o DNA e, depois, como recuperá-lo ao máximo após o processamento.

Um MR microbiológico que atenda aos requisitos pode ser usado em um estudo de certificação, levando a um MRC. Múrtula *et al.* (2010) propuseram um fluxo de processo desde a produção até a certificação de um MRC microbiológico (Figura 10).

Alguns exemplos de produção e certificação de MR estão descritos na literatura. Janning, *et al.* (1995) descreveram os resultados de dois estudos de certificação satisfatoriamente concluídos, para dois MRCs contendo as estirpes bacterianas de *Salmonella typhimurium* (5 UFC/cápsula) e *Enterococcus faecium* (500 UFC/cápsula), respectivamente.

Múrtula *et al.* (2010) desenvolveram e validaram um novo MR, em formato de comprimido, para a quantificação de *Legionella pneumophila* e *Salmonella* spp. por PCR quantitativo (qPCR). Este novo MR foi indicado para ser utilizado no controle interno de qualidade, na organização de ensaios de proficiência, bem como na validação de métodos moleculares baseados em qPCR.

Baume *et al.* (2013) caracterizaram e certificaram um material de referência quantitativo de DNA de *Legionella* como padrão primário de medição de *Legionella* por qPCR. Doze laboratórios participaram do estudo colaborativo onde o MR foi analisado por ensaios de diluição limitante baseados em PCR (LDAs). O método permitiu a quantificação direta da quantidade de DNA de *Legionella* em unidades genômicas (GU) e a determinação das incertezas associadas. O uso deste MRC foi integrado à norma francesa NF T90-471 e na especificação técnica da ISO 12869 para validar os métodos qPCR e garantir sua confiabilidade.

O *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), como parte da Comissão Europeia, concentra seus esforços no desenvolvimento de MRs para apoiar o desenvolvimento, implementação e monitoramento da legislação da União Europeia. Um foco especial é dado aos MRs para testes de presença/ausência e enumeração em análise microbiológica de alimentos e água. Outro grupo de novos MRs certificados pelo IRMM

compreende materiais baseados em DNA para controlar a identidade de micro-organismos em ensaios qualitativos (Philipp *et al.*, 2007). Um exemplo de MRC disponível no IRMM consiste no DNA genômico purificado de *Listeria monocytogenes* (IRMM-447), para uso como controle positivo na identificação e detecção de *Listeria monocytogenes* em diagnósticos por PCR.

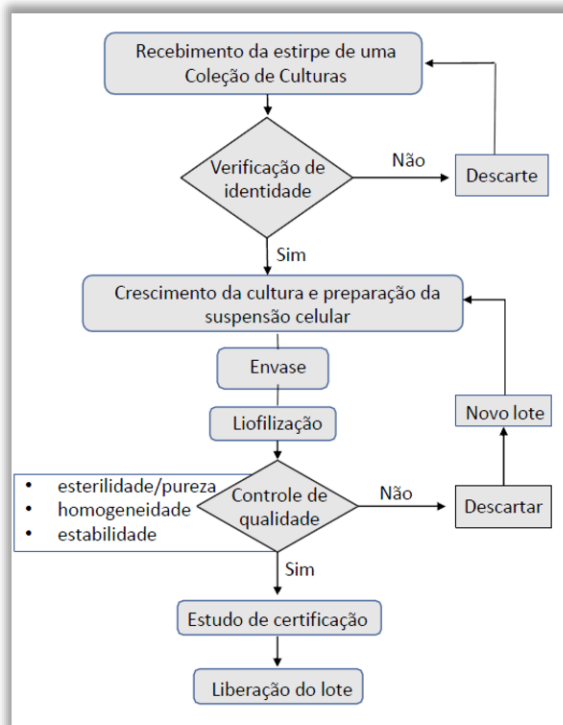


Figura 10 - Fluxo do processo de produção e certificação de um MRC microbiológico
 Fonte: Múrtula *et al.*, 2010

3.7.2 Padrões biológicos

Biológicos são “*substâncias que não podem ser completamente caracterizadas apenas por meios físico-químicos e que, portanto, requerem o uso de alguma forma de bioensaio*”. Bioensaio por sua vez, consiste em “*um procedimento de laboratório para a estimativa da natureza ou potência de um material por meio da reação que ocorre após sua aplicação a algum elemento de um sistema vivo (exemplos incluem animais, tecidos, células, receptores e enzimas)*”. Os ensaios biológicos são geralmente comparativos e não absolutos, e o padrão de referência é crítico para definir a natureza qualitativa e a magnitude relativa da resposta biológica (WHO, 2011).

Muitos padrões de referência biológica da OMS são designados como Padrões Internacionais (PI) e fornecem a base física única para a definição de Unidades Internacionais (UI) de atividade biológica e/ou imunológica. Seu uso permite a obtenção de consistência na mensuração de atributos-chave de produtos biológicos, por exemplo, potência biológica ou atividade imunológica e, assim, o desenvolvimento de critérios internacionalmente aceitos para padronização e controle de produtos. Também fornece a base para a comparabilidade de dados de diferentes fontes em relação a produtos específicos. Os ensaios para marcadores de imunidade (por exemplo, para agentes infecciosos) são frequentemente definidos em termos de UIs de anticorpos, proporcionando uma base para um consenso internacional sobre a medição

do estado imunológico de indivíduos ou populações após a vacinação ou infecção (WHO, 2006).

Geralmente (embora não universalmente), um Padrão Internacional (PI) da OMS é o padrão de mais alta ordem para medir a atividade biológica de um analito. A esse respeito, pode ser considerado equivalente a um padrão primário. O elemento importante desse *status* é que, na maioria dos casos, o Padrão Internacional não é rastreável a um material de referência de nível superior, e a Unidade Internacional (UI) atribuída ao material é de fato definida por esse material e não definida por nenhum padrão externo. Quando um PI substitui um padrão anterior do mesmo analito, e esforços cuidadosos são feitos para assegurar que o valor da unidade seja mantido, a relação entre os dois não é, portanto, um relacionamento “padrão primário-padrão secundário”, mas aquele em que o primeiro padrão é descontinuado e seu substituto estabelecido como o novo Padrão de maior ordem.

Alguns padrões de referência biológica da OMS não carregam a designação de PI, mas são, no entanto, de grande valor na padronização de ensaios aplicados a produtos biológicos e materiais de diagnóstico (WHO, 2006). O termo Padrão Secundário é utilizado para englobar os padrões desenvolvidos por autoridades regionais ou nacionais, ou por outras organizações, os quais são calibrados contra um PI. O valor atribuído aos padrões biológicos secundários é geralmente definido em unidades rastreáveis ao PI de ordem superior. Eles são projetados para fornecer às organizações nacionais, regionais e outras, maiores quantidades de material calibrado e certificado, que possa ser usado no controle de lotes e em outras atividades de desenvolvimento de produto, para as quais o Padrão Internacional pode não estar disponível devido ao fornecimento limitado.

As recomendações da OMS para a preparação, caracterização e estabelecimento de Padrões Internacionais (PI) e outros padrões de referência biológicos foram revisadas em 2004 (WHO, 2006) e incluem uma seção sobre a preparação de Padrões Nacionais.

O objetivo dos padrões de referência é facilitar a caracterização padronizada de amostras biológicas. Em particular, estes têm um papel essencial no desenvolvimento de sistemas internacionalmente acordados para a medição das atividades biológicas e imunológicas de produtos biológicos.

Seu uso é fundamental para garantir a qualidade de produtos, bem como a consistência da produção, sendo essenciais para o estabelecimento de uma dosagem clínica apropriada. Estas preparações são também importantes quando utilizadas na caracterização de preparações de referência secundárias (padrões de trabalho regionais, nacionais ou internas). Adicionalmente, também podem ser usados na qualificação ou validação de métodos de ensaio para assegurar a uniformidade na determinação da potência ou atividade de preparações biológicas.

O volume de trabalho e tempo envolvidos na preparação e calibração dos padrões são consideráveis e não devem ser menosprezados. Extensa experiência e especialização são necessárias, incluindo suporte estatístico apropriado. É necessário que as características de resposta à dose do padrão sejam as mesmas das amostras de teste e que o paralelismo seja demonstrado para todos os tipos de teste nos quais o padrão seja usado.

3.7.3 Produção de Materiais de Referência

A produção de materiais de referência é uma importante ramificação dos processos de medição e de produção os quais envolvem, em muitos casos, pesquisa e desenvolvimento, além de um minucioso estudo sobre custo de todas as atividades envolvidas. Dessa forma, a produção de materiais de referência não pode ser entendida com uma atividade trivial e sim merecedora de grande atenção por todos aqueles que pretendem produzir um material certificado (Ulrich, 2011). Um Sistema de Gestão da Qualidade implantado é vital não apenas para assegurar a

confiabilidade desses materiais, mas também para fornecer ao cliente e ao usuário a evidência clara da confiabilidade.

Um MRC deve ser apropriado para o papel rigoroso que ele desempenha e, além de critérios legais ou comerciais que também podem ser relevantes, os seguintes critérios técnicos se aplicam em geral à adequação do uso dos MRC:

- a) O próprio MRC e os valores de propriedade a ele atribuídos devem ser estáveis por um período de tempo aceitável, sob condições reais de armazenamento, transporte e utilização;
- b) O MRC deve ser suficientemente homogêneo, para que os valores de propriedade medidos em uma porção do lote se apliquem a qualquer outra porção do lote dentro de limites aceitáveis de incerteza;
- c) Os valores de propriedade de um MRC devem ter sido estabelecidos com uma incerteza suficiente para utilização final do MRC.
- d) Deve estar disponível documentação clara relativa ao MRC e seus valores de propriedade estabelecidos. Os valores de propriedade devem ter sido certificados, de modo que a documentação inclua um certificado, elaborado de acordo com a ABNT ISO GUIA 31 (2017a).

3.7.3.1 Estudo de homogeneidade

O termo “homogeneidade”, segundo a ABNT ISO GUIA 30 (2016), é definido como a “uniformidade de um valor de propriedade especificado por meio de uma porção definida de um material de referência”. Na prática, um material é aceito como homogêneo com respeito a uma dada propriedade se a diferença entre os valores desta característica de uma parte (ou item) para outra for desprezível quando comparada à componente de incerteza oriunda, por exemplo, da caracterização.

Estudos de homogeneidade são de fundamental importância em projetos de certificação de lotes e dois tipos importantes de homogeneidade devem ser considerados. Primeiramente, a homogeneidade dentro de cada unidade ou frasco, que pode ser minimizada com instruções apropriadas para utilização do material, como remistura da amostra ou o consumo mínimo de amostra, para o qual a incerteza estabelecida ainda é válida. Um segundo tipo de homogeneidade, entre unidades ou frascos, a qual se refere à variação de unidade para unidade e depende muito da natureza do material (ISO, 2017; ABNT, 2012; Linsinger *et al.*, 2001). O elemento comum em ambos os tipos de experimentos é que a separação entre o efeito (homogeneidade) e a variabilidade de medição (analítica) devem ser estabelecidas (Linsinger *et al.*, 2001).

Na preparação dos materiais de referência, espera-se que os mesmos tenham alto grau de homogeneidade. Porém, apesar de todo esforço realizado, os materiais podem apresentar alguma heterogeneidade (ISO, 2017; ABNT, 2012).

A determinação da variação remanescente entre frascos do lote é um componente de incerteza que será incluído na estimativa da incerteza do valor de propriedade do MRC (ISO, 2017; ABNT, 2012; Van Der Veen *et al.*, 2001a).

3.7.3.2 Estabilidade

“Estabilidade”, segundo ABNT ISO GUIA 30 (2016) é definida como “a característica de um material de referência, quando armazenado sob condições especificadas, de manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um tempo especificado”.

Em primeiro lugar, podemos tentar evitar a deterioração dos padrões pelo armazenamento eficiente. Em geral, a deterioração deve ser assumida como sendo o resultado de uma alteração química na preparação e conseqüentemente nós podemos dificultar a ocorrência de alterações químicas. Isso é feito removendo, na medida do possível, cinco dos fatores comuns que favorecem reações químicas, a saber: calor, luz, água, oxigênio e micro-organismos (Jerne; Perry, 1956).

Mas, mesmo com essas precauções, o teste de estabilidade é crucial no processo de certificação de MRs. O valor da propriedade a ser medido em um MR deve ser constante durante toda a validade do material. Com frequência, é igualmente importante saber o que poderia acontecer à amostra se as condições apropriadas de transporte não forem mantidas. Portanto, os estudos de estabilidade são realizados não apenas para avaliar a incerteza de medição associada à estabilidade do material, mas também para poder especificar as condições apropriadas de armazenamento e transporte.

A previsão da estabilidade a longo prazo por estudos acelerados pode não ser clara. Por isso, WHO (2011) sugere dados em tempo real como a melhor abordagem para avaliar a estabilidade do padrão.

ABNT ISO GUIA 35 (2012) e ISO GUIDE 35 (2017) consideram dois tipos de estabilidade na certificação de materiais de referência: a estabilidade a longo prazo do material (por exemplo, o tempo de prateleira) e a estabilidade a curto prazo (por exemplo, estabilidade do material sob “condições de transporte”).

As duas estabilidades são determinadas por procedimentos experimentais similares; as diferenças são o prazo e condições de armazenagem. No caso do estudo de curta duração são utilizados períodos mais curtos em condições mais drásticas como temperaturas altas. No caso do estudo de longa duração são utilizados períodos mais longos com condições menos drásticas. Em ambos os estudos é recomendável a realização do estudo em mais de uma temperatura (Tappin, 2012).

Há dois planejamentos experimentais básicos para os estudos de estabilidade: o estudo clássico e o estudo isócrono. No estudo clássico, amostras individuais são avaliadas na medida em que o tempo transcorre. Neste caso, o trabalho é realizado sob condições de reprodutibilidade interna, o que leva a uma incerteza maior, pois a instabilidade do sistema de medição também está incluída. No estudo isócrono, todas as medições do estudo ocorrem sob condições de repetibilidade, isto é, todas as medições ocorrem em um único momento e não ao longo do período de tempo do estudo. A abordagem isócrona reduz a dispersão dos pontos no tempo, e usualmente, reduz a incerteza. Porém, há alguns casos onde questões operacionais ou econômicas impedem que este tipo de delineamento seja utilizado.

Ambos os planejamentos experimentais são adequados para estudos de estabilidade a longo prazo e a curto prazo. No caso do estudo de estabilidade a curto prazo, o comportamento do material e seus valores de propriedade é estudado, no mínimo, nas condições recomendadas (especificadas) para a embalagem e transporte. Recomenda-se aplicar condições para o transporte segundo as quais a instabilidade não seja maior do que no estudo de estabilidade a longo prazo, de modo que nenhuma contribuição da incerteza para a estabilidade/instabilidade a curto prazo precise ser incluída na certificação (Ulrich, 2011).

Quando não for possível manter as condições apropriadas relativas à estabilidade durante o transporte, é recomendado que seja considerada uma incerteza extra nos valores de propriedade certificados.

A estabilidade de uma preparação que requer bioensaio é estimada comparando sua potência antes e depois do armazenamento com a do padrão assumido como estável. A resposta de um grupo de animais depende da concepção do ensaio, das condições ambientais e das linhagens dos animais utilizados. Todos esses fatores podem variar dia a dia, e estimativas

confiáveis e reprodutíveis de potência raramente são atingíveis. No entanto, dentro de qualquer colônia endogâmica de animais, mantida sob condições uniformes, a dose de uma preparação particular - o padrão necessário para produzir, em um tipo particular de ensaio, uma resposta animal fixa - pode ser razoavelmente constante. Pode, em qualquer caso, ser suficientemente constante para permitir que uma tendência contínua em qualquer direção seja aparente. (Jerne; Perry, 1956)

Se padrões dos usuários (vacinas/indústrias) forem feitos e estiverem frequentemente comparados com o Padrão Nacional, e se a potência permanece constante, é forte evidência presuntiva de que as preparações são estáveis. No entanto, é apenas uma evidência presumida. A possibilidade sempre existe de que preparações similares estejam todas sujeitas ao mesmo tipo de degradação química ocorrendo na mesma taxa.

Embora várias preparações altamente purificadas, por exemplo, a insulina, possam deteriorar-se de forma concebível à mesma velocidade devido a uma alteração química particular, é improvável que várias preparações muito impuras, talvez variando muito umas das outras, o façam. Isto é especialmente verdadeiro em relação a preparações como antitoxinas e vacinas. (Jerne; Perry, 1956)

Além disso, há duas outras observações a serem feitas: primeiro, que o erro do bioensaio é muitas vezes tão grande que as limitações de tempo e dinheiro tornam impraticável a realização de comparações suficientemente precisas para permitir a detecção de graus menores de deterioração, e em segundo lugar, que não existem Padrões Internacionais para todas as substâncias para as quais existem Padrões Nacionais. Este último ponto enfatiza a conveniência da continuação e extensão da prática atual de produzir, sempre que possível, padrões nacionais (Jerne; Perry, 1956).

3.7.3.3 Caracterização do material de referência

Os materiais de referência geralmente são caracterizados baseados na exatidão de todo o processo experimental e desse modo o valor certificado da propriedade representa a melhor estimativa do valor verdadeiro. A incerteza declarada desse valor da propriedade deve levar em consideração todos efeitos casuais e sistemáticos inerentes ao processo de medição, tão bem como a variabilidade entre as amostras (homogeneidade) e o tempo de validade do material (estabilidade) (Van Der Veen *et al.*, 2001b).

A ABNT ISO 17034 (2017b), bem como a ISO Guide 35 (2017) indicam quatro procedimentos tecnicamente válidos que o produtor do MR pode empregar na caracterização do material de referência:

- a) utilização de um único procedimento de medição de referência em um único laboratório;
- b) caracterização de um mensurando não definido operacionalmente utilizando dois ou mais métodos com exatidão demonstrada, em um ou mais laboratórios competentes;
- c) caracterização de um mensurando definido operacionalmente usando uma rede de laboratórios competentes;
- d) transferência de valor de um MR para um candidato a MR estreitamente similar usando um único procedimento de medição realizado por um laboratório;
- e) caracterização baseada em massa ou volume de ingredientes utilizados no preparo do MR.

A escolha por uma delas dependerá do tipo de material de referência, do seu uso pretendido, da competência dos laboratórios envolvidos e da qualidade dos métodos empregados (Cardoso, 2008).

Os dados relatados podem ser formatados em matrizes contendo:

- uma estimativa apropriada para a propriedade sob determinação (média) e uma declaração de incerteza, ou
- um certo número de resultados de medição individuais de propriedade sob consideração (replicatas), para cada laboratório participante.

O primeiro formato permite avaliação baseada na incerteza pressupondo-se que os laboratórios participantes tenham modelos de medição adequados, enquanto que o segundo formato (o mais clássico deles) requer uma avaliação estatística baseada em hipóteses com respeito às funções de distribuição subjacentes (ABNT, 2012).

3.7.3.4 Cálculo da incerteza do MRC

Uma definição para incerteza de medição é “*um parâmetro associado a um resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando*” (INMETRO, 2012). Desta forma, a determinação da incerteza implica em uma maior confiança na validade do resultado da medição (EURACHEM/CITAC, 2012).

A abordagem das incertezas, conforme indicada na ABNT ISO GUIA 35 (2012) e ISO GUIDE 35 (2017), mostra a importância de se obter as incertezas em todas as etapas de preparação de materiais de referência e assim contribuir para o valor da incerteza final que acompanha o valor de propriedade de um determinado material.

Para se obter a incerteza expandida U , para a qual se pressupõe o intervalo da propriedade ($x - U$, $x + U$) a incerteza combinada é multiplicada por um fator de abrangência k , geralmente igual a 2, baseado no nível de confiança igual a 95%.

Na prática, existem muitas outras fontes possíveis de erros em uma medição, entre elas pode-se destacar: definição incompleta do mensurando, amostragem não representativa, valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência, entre outras. Essas fontes não são necessariamente independentes e algumas podem contribuir sobre outras e causar variações nas observações repetidas do mensurando sob condições idênticas.

A avaliação da incerteza também não visa levar em conta acidentes, erros, uso impróprio, transporte inadequado do MRC, dentre outros fatores. Portanto, a manutenção de um sistema de gestão da qualidade adequado no laboratório é imprescindível para a qualidade da medição e da produção e certificação de materiais de referência.

3.7.3.4.1 Aplicações

Os modelos de cálculos existentes, assim como os guias para cálculos de incerteza (JCGM, 2008; EURACHEM/CITAC, 2012) contribuem de forma essencial para o entendimento e avaliação das incertezas nos laboratórios, porém, os dados sempre devem passar por uma análise crítica de especialistas com habilidade e experiência profissional na área estudada.

Worbs *et al.* (2015) apresentaram os resultados do primeiro ensaio de proficiência (EP) internacional, sobre a detecção e quantificação de neurotoxinas botulínicas. O EP foi conduzido no âmbito do projeto EQuatox da União Europeia, e as amostras do teste incluíram os sorotipos A, B e E da neurotoxina botulínica adicionados em tampão, leite, extrato de carne e soro. Diferentes métodos foram aplicados pelos participantes, combinando diferentes princípios de detecção, identificação e quantificação. Descobriu-se que a quantificação precisa de BoNT era difícil, resultando em uma dispersão substancial de dados quantitativos. Isto foi especialmente verdadeiro para os resultados obtidos pelo bioensaio com camundongos, que é atualmente

considerado como “padrão ouro” para a detecção de neurotoxinas botulínicas (Worbs *et al.*, 2015).

No geral, os resultados obtidos pelo bioensaio em camundongos foram satisfatórios, obtendo 97.6% de resultados corretos. Porém o método apresentou a maior média do escore z (31,4) em relação aos demais métodos, com menor concordância entre os escores-z entre amostras e laboratórios (alto desvio-padrão).

Os dados de z-escore oferecem uma diretriz para avaliar a proximidade média de um método com a concentração atribuída se aplicados por um número de laboratórios a um número de amostras, e o desvio padrão correspondente mede a variação dos z-escores entre as respectivas amostras e laboratórios.

A variação dos resultados pode ser explicada por parâmetros experimentais, como a preparação da amostra, a idade e a linhagem dos camundongos ou outros fatores (Worbs *et al.*, 2015).

Outro fator crítico que pode ter influenciado os dados quantitativos obtidos pelo estudo foi em relação aos diferentes padrões de referência utilizados. O laboratório organizador comparou dois métodos de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizados pelos diferentes participantes e dois padrões diferentes de neurotoxina botulínica do tipo A de 150 kDa usados no EP. Para as ferramentas e ensaios selecionados, os resultados mostraram que o uso de ELISAs diferentes não teve influência significativa na quantificação de amostras contendo neurotoxina botulínica, enquanto o uso de diferentes padrões de referência claramente fez. Com base nesses dados que aguardam investigações adicionais, especulou-se que a heterogeneidade na quantificação de neurotoxinas botulínicas dos tipos A, B e E nas amostras do EP foi provavelmente devido aos diferentes materiais de referência utilizados. Assim, a quantificação da neurotoxina botulínica, só poderá ser melhorada se um padrão de referência certificado se tornar disponível (Worbs *et al.*, 2015).

4. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* tipos C e D

4.1. Introdução

Produtos biológicos correspondem a células, tecidos, micro-organismos e seus derivados, e devem refletir a variabilidade inerente dos materiais vivos. As substâncias ativas nos produtos biológicos são frequentemente complexas para serem completamente caracterizadas, utilizando apenas testes físico-químicos e podem apresentar heterogeneidade marcante entre preparações ou lotes.

Atualmente estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D são empregadas por indústrias veterinárias na produção de vacinas anti-botulínicas, e pelo órgão regulador (MAPA) na produção de padrões de referência de toxinas botulínicas, que posteriormente são usados na produção de padrões de referência de antitoxinas botulínicas tipos C e D. Esses padrões de toxinas e antitoxinas são utilizados tanto no controle de vacinas quanto no diagnóstico de casos suspeitos de botulismo animal.

No entanto, até o presente momento, a caracterização e tipificação dessas estirpes foi realizada apenas com métodos fenotípicos, bioquímicos e sorológicos, os quais são insuficientes para uma caracterização mais exata, que inclua tipos mosaicos (C/D e D/C) pertencentes ao Grupo III de *Clostridium botulinum*.

Os objetivos específicos da etapa descrita neste capítulo, consistiram em caracterizar e tipificar amostras de *Clostridium botulinum* do Grupo III, mantidas atualmente por indústrias veterinárias e pelo órgão regulador, como amostras dos tipos C e D típicas ou mosaicos, com a utilização de métodos microbiológicos clássicos, técnicas moleculares e de sequenciamento genômico. Utilizar dados de sequenciamento genômico para realizar comparações genômicas com sequências disponíveis no GenBank, avaliando principalmente o gene que codifica a BoNT, mas também genes de proteínas acessórias e elementos genéticos móveis.

4.2. Material e métodos

4.2.1 Local de realização do experimento

Os experimentos relacionados à caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *Clostridium botulinum* foram realizados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG; no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório Oficial Central – Aquacen Saúde Animal, localizado em Belo Horizonte/MG. Análises por PCR em tempo real e sequenciamentos genômicos foram realizados no Laboratório de Saúde Animal da ANSES (*French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety*), localizado em Maisons-Alfort, França e a Faculdade de Veterinária da Universidade de Helsinki, localizada em Helsinki, Finlândia.

4.2.2 Amostras: Estirpes bacterianas

Foram empregadas 15 estirpes de *Clostridium botulinum* provenientes: do banco de referência do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG) e de indústrias veterinárias produtoras de vacinas contra o botulismo (Tabela 2).

Tabela 2 – Códigos e procedências das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D utilizadas nesse trabalho

Procedência	Código	País de origem
Banco de referência LFDA-MG	CBC 02, CBD 09	
Indústria veterinária (IND001)	1272, 1274, 1275, 1276, 1277, CP05, CP07, CB 05/18, CB 06/18	Brasil
Indústria veterinária (IND002)	CB 03/18, CB 04/18	
Indústria veterinária (IND003)	CB 07/18, CB 08/18	

As estirpes foram mantidas em sua forma original, normalmente liofilizadas, até o início dos testes. Segundo informado pelas indústrias veterinárias que colaboraram nesse estudo, as estirpes CB 03/18 a CB 08/18 eram utilizadas na produção de partidas de vacinas contra o botulismo.

4.2.3 Reconstituição e teste de pureza das amostras

Para confirmação da viabilidade das amostras, as mesmas foram avaliadas quanto à pureza e capacidade de crescimento em anaerobiose.

Cada amostra liofilizada foi reconstituída com 2 mL de meio de cultura e transferida para dois tubos de ensaio com tampa rosca contendo 20 mL do mesmo meio. Os meios de cultura empregados foram *Cooked Meat Medium* – CMM (Oxoid) e o *Reinforced Clostridial Medium* - RCM (Difco). Os tubos foram incubados a 37°C, em jarra de anaerobiose de 3L (Oxoid) contendo sachê gerador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid) ou em câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific), com mistura gasosa contendo 10% de H₂, 10% de CO₂ e 80% de N₂ por 24 a 48 horas. Após esse período, as amostras foram semeadas em placas com ágar sangue de carneiro a 5% (AS) ou em ágar gema de ovo. As placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e pelo menos uma placa foi incubada em aerobiose para avaliação de possíveis contaminantes (Maslanka *et al.*, 2016).

As unidades formadoras de colônias foram avaliadas por morfologia de colônia, aspecto da hemólise em ágar sangue, presença de lipase em ágar gema de ovo, método de Gram e visualização dos esporos no corpo celular (CDC, 2010).

Para manutenção de amostras de trabalho, as estirpes de *Clostridium botulinum* foram inoculadas em CMM, a partir do cultivo em RCM, na proporção de 10% v/v e, após crescimento obtido pela incubação a 37°C, em anaerobiose por 48 horas, sendo mantidas à temperatura ambiente (Silas *et al.*, 1985).

4.2.4 Tipificação e confirmação da identidade das estirpes

4.2.4.1 Obtenção da amostra

Amostra de DNA foi obtida a partir de seleção de de uma a três unidades formadoras de colônia (UFCs) características de *Clostridium botulinum*, após crescimento em placas de ágar sangue ou ágar gema de ovo, ou a partir de uma alíquota (100 µL) de meio RCM com crescimento. As amostras foram ressuspensas em 400 µL água Milli-q, centrifugadas a 6000 rpm (Hsiangtai MCD-2000) por 10 minutos e o *pellet* formado foi utilizado para extração do DNA.

4.2.4.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído após reconstituição do *pellet* em 400 µL água Milli-q, usando os seguintes protocolos:

- Para a PCR duplex convencional, as amostras foram aquecidas a 98°C por 20 minutos para lise da célula bacteriana e liberação do material genético, e centrifugadas a 6000 rpm (Hsiangtai MCD-2000) por 10 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado, armazenado de 4°C a 8°C até o momento do uso e foi utilizado como molde na PCR (Prévot *et al.*, 2007).

- Para as demais PCRs e para o sequenciamento genômico, as amostras de DNA foram extraídas usando *DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen, Hilden) ou *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit* (Promega), combinado com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL), e de acordo com as instruções do fabricante para bactérias Gram-positivas. Idealmente as amostras deveriam conter no mínimo 2 µg de DNA (por exemplo, 100 µL a 20 ng/µL).

As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a realização das análises.

4.2.4.3 PCR duplex convencional

Amostras de DNA das estirpes de *Clostridium botulinum* foram submetidas a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) duplex convencional, adaptada de Prévot *et al.* (2007), que permite a tipificação simultânea dos genes da toxina botulínica C (*bont/C*) e D (*bont/D*). Os iniciadores (*primers*) utilizados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - *Primers* utilizados para identificação dos genes codificadores das toxinas botulínicas tipos C e D, tamanho do produto amplificado (pb) e referência utilizada

BoNT	Sequência (3'– 5')*	Tamanho dos amplicons	Referência
<i>C. botulinum</i> tipo C	CBC_F TCCTCGAGTTACAAGCC	169 pb	Prevot <i>et al.</i> , (2007)
	CBC_R CAGGAAAGGGTATATCTG		
<i>C. botulinum</i> tipo D	CBD_F TTAGACTATACAGCATCCC	264 pb	
	CBD_R TAACTTGTGGACGAATCC		

*cadeia leve das respectivas BoNT

A reação foi realizada com 1X de PCR Tampão 5X, 1,5mM de MgCl₂, 1mM de dNTP (Promega), 0,8 µM de iniciadores BoNT/C, 0,8 µM de iniciadores BoNT/C (IDT), 1,25U de *Taq* Polimerase (Go Taq Flexi DNA Polymerase, Promega), 10 µL de DNA e q.s.p de água ultrapura para um volume final de 25 µL. Como controle negativo foram utilizados os reagentes do mix de PCR. A PCR foi realizada em termociclador (Modelo 9902 Veriti 96-Well, Applied Biosystems) e as condições de reação estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Ciclo de temperaturas para a PCR duplex convencional de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Ciclo				
Desnaturação Inicial	Desnaturação*	Anelamento*	Extensão*	Extensão Final
94°C por 4 min	94°C por 30 s	48°C por 30 s	72°C por 30s	72°C por 10min

* Passos repetidos 40 vezes.

Para análise dos produtos amplificados (*amplicons*), 10µL foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% p/v, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio, conduzida em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, a 120 volts, com corrente elétrica de até 40mA, por 40 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados por comparação ao

marcador de tamanho molecular 100 bp DNA ladder (Kasvi), após visualização sob luz ultravioleta em fotodocumentador ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

4.2.4.4 PCR em tempo real para identificação de mosaicos C/D e D/C de *Clostridium botulinum*

Amostras de DNA das estirpes de *Clostridium botulinum* também foram analisadas por PCR em tempo real, utilizando os *primers* descritos por Woudstra *et al.* (2012) e Nakamura *et al.* (2013), a qual inclui a identificação de tipos mosaicos. Resumidamente, a PCR foi realizada utilizando o kit *PerfeCTa qPCR ToughMix* (Quanta bio) e conduzida no equipamento *CFX96® Real-time PCR Detection System* (Bio-Rad), em um volume final de 25 µL. *Primers* e sondas foram fornecidos por Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier). As sondas foram marcadas em 5' com 6-carboxi-x-rodamina (ROX) e em 3' com *Black Hole Quencher* (BHQ-2). *Primers* foram incorporados para uma concentração final de 300 nM e as sondas de 300 nM para a PCR. O seguinte perfil térmico foi usado: 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s e 55°C por 30 s. Relação de *primers* e sondas para o gene *bont* utilizados estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Relação dos *primers* e sondas utilizados na PCR em tempo real para o gene *bont* em amostras de DNA de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C, D, C/D e D/C

Primer ou probe ^a	Sequência (5'-3') ^b	Tipos <i>bont</i> alvos	Tamanho amplicon (bp)
C-I_F	TCCTGGGAATAACAATACTC	C, C/D	135
C-I_R	CTAGGTCCAGTTATTATAACAC		
C-I_P	[ROX]AACCCAGTTGTACCTTGCTAGTTT[BHQ2]		
C-II_F	GGGTCAAAATTTATCTCG	C, C/D	135
C-II_R	AGCTCTCTACAATCTAATG		
C-II_P	[ROX]ATCCAGCATTAAAGAAAAGTCAATCCT[BHQ2]		
C-III_F	TCAGCTTAATCCAATATTTCC	C, D/C	77
C-III_R	GGGTACTATAACTTTACCTC		
C-III_P	[ROX]CCCTGAACTACCTAATTTAAAGTCAAA[BHQ2]		
D-C_F	GACTGATTTAGTTCCACTAG	D/C	82
D-C_R	GCATGGTTGTATTATAAACG		
D-C_P	[ROX]ACGTATCTCATCCATTGGTTGATC[BHQ2]		
D-I_F	TCCAGTAATAGCTTTAATGC	D, D/C	141
D-I_R	TCCTCAAATTGTACGTTG		
D-I_P	[ROX]AAATCCCTCGTAACTTGTGGAC[BHQ2]		
D-II_F	GAAGCATTAGGTTATAGCAATAAG	D, D/C	116
D-II_R	TCCTCAACTACTTCATTG		
D-II_P	[ROX]AGAATAAACCTGCTTGAACACCTTT[BHQ2]		
D-III_F	ATGGCAATATAGAATGGA	D, C/D	138
D-III_R	ACCCATTATATTATTAGTTATAG		
D-III_P	[ROX]ATCCTGTATGACTTAATGATTCACCT[BHQ2]		

^a Sufixo F, forward (primer); R, reverse (primer); P, probe.

^bROX, 6-carboxy-x-rhodamine; BHQ, Black Hole Quencher.

Nesta PCR, resultados positivos para *Clostridium botulinum* tipo C são obtidos quando há sinais positivos para C-II e C-III, e resultados negativos para D-C, D-II, D-III. Resultado positivo para *Clostridium botulinum* tipo D é obtido quando há sinais positivos para D-II e D-III, e negativos para C-II, C-III, D-C. Resultado positivo para o tipo mosaico C/D, é obtido quando há sinais positivos para C-II e D-III, e resultados negativos para C-III, DC, D-II. Resultado positivo para o tipo mosaico DC, é obtido quando há sinais positivos para C-III, DC e D-II, e resultados negativos para C-II, D-III. Todos os resultados devem estar acompanhados por resultados satisfatórios dos controles do método.

Os *primers* utilizados para *ntnha*, conforme descrito por Nakamura *et al.* (2013) foram: *ntnha_F* AGGAGGATATTCTTCACCAA e *ntnha_R* TAGTTAGCTCCATTGCAGGAT.

4.2.4.5 PCR em tempo real para a investigação de elementos genéticos móveis

Amostras de DNA das estirpes de *Clostridium botulinum* também foram analisadas por PCR em tempo real para a investigação de elementos genéticos móveis referentes a outras toxinas. Foram utilizados como referência os plasmídeos p1 a p5 identificados na estirpe de referência BKT015925 (nº acesso NCBI NC_015417.1) e p6 na estirpe C Stockholm (nº acesso NCBI AP008983) (Skarin *et al.*, 2011).

As ampliações foram realizadas conforme descrito por Woudstra *et al.* (2018). Resumidamente, a PCR foi realizada utilizando o LightCycler® 1536 (Roche), em um volume final de 2 µL. *Primers* e sondas *TaqMan*® (marcadas com 6-FAM (6-fluorescein amidite) e BHQ-1) foram usadas em uma concentração final de 300 nM para a PCR. O seguinte perfil térmico foi usado: 95°C por 2 min seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s e 55°C por 30s. A relação dos *primers* e sondas utilizados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação dos *primers* e sondas utilizados na PCR em tempo real para a investigação de elementos genéticos móveis em estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C, D, C/D e D/C

Primer ou probe ^a	Sequência (5' - 3') ^b	Tamanho amplicon (bp)
p2_alphatox_F p2_alphatox_R p2_alphatox_P	GCACTTTGTACATCACTTATAGC CTGGTATTTTGTAATTCCTACTAGC ACCTTATACTCACGCCCTTGCTTCTAC	103
p3_C2-I_F p3_C2-I_R p3_C2-I_P	CTGCATTCAGATTATAAAGCTA AGAGCAGAACTTATTAATTCAA AAGCTCGTCATTATTTGGAECTTATT	101
p3_C2-II_F p3_C2-II_R p3_C2-II_P	TGCTCCAGTGTATAATGTTA GTTCCACCAGGATTAGATA ACAATCTGTAGCCACTATTAAGGGACA	114
p4_HypTox_F p4_HypTox_R p4_HypTox_P	AAGGGTTTTATTTCCAACA CAGCAACAACAGAATTTAG AATACCTCTAATTTAGAAGGGAACTTACA	75
p5_Epsilon-tox-I_F p5_Epsilon-tox-I_R p5_Epsilon-tox-I_P	GAGGAATTAGCCATTCTAGC GGGATATGATTATATTGATTGTTGG ACCACTTACACAAGGATGACCACCTG	117
p5_Epsilon-tox-II_F p5_Epsilon-tox-II_R p5_Epsilon-tox-II_P	CTCCAAAGTTAAAATCACCAC ATGGGATTAAGGTAGGGTG TTCTACAGTTCCTTCAACACCATTACC	110
p6_bacteriocin_F p6_bacteriocin_R p6_bacteriocin_P	GGTGAAGTTATAGATAATGATGC GCTCTAAGTAAAAGTTCATCTG AAATGCTTTACCTAAATATCCATACGCTA	92

^a Sufixo F, forward (primer); R, reverse (primer); P, probe.

^b Todos os probes foram marcados com 6-FAM (6-fluorescein amidite) e BHQ1 (Black Hole Quencher).

4.2.5 Sequenciamento genômico de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Sequenciamentos genômico e análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório Oficial Central – Aquacen Saúde Animal; no Laboratório de Saúde Animal da ANSES e na Faculdade de Veterinária da Universidade de Helsinki. Na Tabela 7 está apresentada a relação das estirpes, o local de realização do sequenciamento genômico e a tecnologia utilizada.

Tabela 7 – Estirpes de *Clostridium botulinum* submetidas ao sequenciamento genômico, indicando local e tecnologia utilizada.

Estirpes	Local do sequenciamento	Tecnologia utilizada
1274		
1275		
1276	ANSES	Illumina MiSeq platform (Illumina)
1277		
CP05		
CBC 02	AQUACEN	Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)
	Fac. Med. Vet. Helsinki	Illumina MiSeq platform (Illumina)
CBD 09		
CB 03/18		
CB 04/18		
CB 05/18	Fac. Med. Vet. Helsinki	Illumina HiSeq platform (Illumina)
CB 07/18		
CB 08/18		

A) Sequenciamentos realizados no Laboratório de Saúde Animal da ANSES:

Bibliotecas foram preparadas usando o *kit Nextera XT* (Illumina). O sequenciamento do genoma completo foi realizado usando uma plataforma Illumina MiSeq (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizadas cinco corridas com MiSeq Reagent Kit v2, três com leituras *paired-end* com 150-nucleotídeos usando célula de fluxo nano, uma com célula de fluxo micro e a última com célula de fluxo padrão.

Os dados brutos foram cortados (comprimento mínimo de 35 pb; índice de qualidade de 0,03) e as seqüências foram montadas em *CLC Genomics Workbench* 8.0.2 por montagem realizada pela primeira vez (comprimento mínimo da *contig* de 1.000 pb). As seqüências foram anotadas com o *pipeline* para anotação automática do genoma (PGAAP - *Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline*) do *National Center for Biothechnology Information* (NCBI).

B) Sequenciamento realizado no Laboratório Oficial Central – Aquacen Saúde Animal:

Bibliotecas foram preparadas usando *Ion Xpress Plus Fragment Libray kit* (Thermo Fisher Scientific) e *Ion Xpress Plus Barcode Adapter 1016 kit* (Thermo Fisher Scientific). O genoma foi sequenciado usando Ion Torrent PGM® (Thermo Fischer Scientific). A qualidade dos dados brutos foi analisada com FastQC e a seqüência estabelecida com o software Mira 4.9.1, Newbler (Roche, USA), SPAdes 35.0 ou outros equivalentes (Pereira et al, 2016). O genoma foi anotado usando como referência seqüências de *Clostridium botulinum* depositadas no GenBank (NCBI).

C) Sequenciamento realizado na Faculdade de Veterinária da Universidade de Helsinki:

Bibliotecas foram preparadas usando *Nextera DNA Flex Library Preparation Kit*

(Illumina), *Blue Pippin automated DNA size selection* (Labgene Scientific). O sequenciamento foi realizado no *HiSeq 2500 System* usando *HiSeq High Output V4 PE101 run* (Illumina).

As sequências foram montadas em *CLC Genomics Workbench 8.0.2* e anotadas com o pipeline RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*).

4.2.6 Comparações genômicas das estirpes

Comparações das sequências de nucleotídeos dos genomas foram realizadas utilizando o *Gegenees* e ferramentas do GenBank (NCBI).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram feitos utilizando o *Muscle (Multiple Sequence Alignment)*. Análises dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos foram feitas também no *MEGA 6.06*, seguidas pela construção das árvores filogenéticas utilizando o modelo de *Neighbor Joining* com 1000 réplicas de *bootstrap* e modelo de substituição de aminoácidos *DayHoff*. Análises filogenéticas foram realizadas no programa *MEGA 6.06* (Tamura *et al.*, 2013).

A Tabela 8 apresenta as sequências utilizadas como referências para as comparações no *Blast* (NCBI) e para construção da árvore filogenética, com suas respectivas denominações e números de acesso, agrupadas por tipo.

Tabela 8 - Sequências de *Clostridium botulinum* coletadas no GenBank, com suas respectivas denominações e números de acesso no NCBI, utilizadas como referência para comparações e na construção da árvore filogenética

Tipo	Denominação	Nº acesso NCBI
C	C-Stockholm	AP008983
	D6F	AB745658
	CB-19	AB200358
	571	AB745657
	573	AB200359
D	16868	KEH96501
	D-1873	AB012112
	CB-16	S49407
C/D	C/D 003-9	AB745666
	BKT015925	NC 015417.1
D/C	OFD05	AB461915

4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Identificação fenotípica das estirpes

As estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D cultivadas neste estudo apresentaram características e morfologias típicas e sugestivas da espécie e similares às descritas por Moura (2011) e Mozzer (2004). Na Figura 11 podem ser observadas imagens dos crescimentos em ágar sangue de carneiro 5% e em ágar gema de ovo.

Em ágar sangue formaram colônias acinzentadas, difusas, beta-hemolíticas, com bordos irregulares. Em ágar gema de ovo, observou-se uma camada em tons de madrepérolas em torno das colônias (reação de lipase) e um halo esbranquiçado opaco de precipitação, dentro das colônias (reação de lecitinase).

A estirpe CB 06/18 (procedência IND 001) apresentou crescimento com contaminação não identificada, a qual não foi possível eliminar e portanto teve que ser descartada.

Não houve crescimento nas placas incubadas em condições de aerobiose.

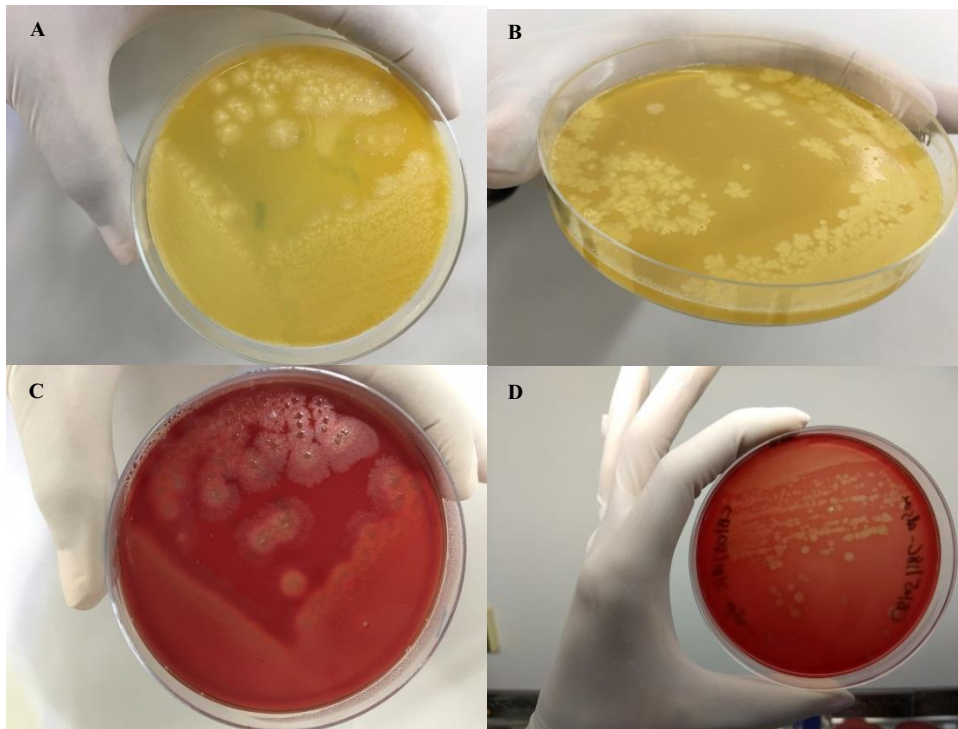


Figura 11 - Fotos de placas com crescimento típico de *Clostridium botulinum* tipos C e D em ágar gema de ovo (A e B) e ágar sangue de carneiro a 5% (C e D)
 Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Oguma *et al.* (1986) estudaram características bioquímicas de onze estirpes toxigênicas de *Clostridium botulinum* tipos C e D e 10 derivadas não-toxigênicas. Todas as estirpes examinadas eram hemolíticas e produziram lipase. A produção de lecitinase foi observada em todas as estirpes testadas, exceto em duas toxigênicas e nos seus respectivos derivados não-toxigênicos.

Nos meios líquidos de cultivo, observou-se a formação de massa celular, ora em suspensão ou como precipitado, além de espuma e formação de gases.

No Gram, as bactérias apresentaram-se como bastonetes Gram-positivo, retos ou levemente curvos, alguns com esporos subterminais. Clostrídios neurotoxigênicos, como outros membros do gênero *Clostridium*, são Gram-positivo, anaeróbio, em forma de bacilos e formadores de esporos, sendo que culturas mais antigas podem ser de coloração variável ao Gram. Os bacilos são retos ou pleomórficos e ocorrem individualmente, em pares ou em cadeias curtas. Filamentos mais longos podem ocorrer em culturas mais antigas (Gyles; Thoen, 1993).

4.3.2 Identificação genotípica das estirpes por PCR

4.3.2.1 Tipificação genotípica

Na tipificação genotípica inicial das estirpes de *Clostridium botulinum*, realizada pela PCR duplex convencional, adaptada de Prévot *et al.* (2007), foi testada a presença de genes *bont/C* e *bont/D*. A Figura 12 apresenta uma foto da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, indicando *amplicons* de 169 pares de base (pb) equivalentes ao *bont/C* e de 264 pb equivalentes ao *bont/D*.

Os testes baseados em PCR têm a vantagem de serem rápidos, fáceis de executar e altamente específicos. Diversos estudos relataram a detecção de genes do tipo C (*bont/C*) e tipo D (*bont/D*) por PCR convencional (Prévot *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2005; Takeshi *et al.*, 1996), enquanto alguns trabalhos propuseram a detecção por PCR em tempo real (Hill *et al.*, 2010; Lindberg *et al.*, 2010).

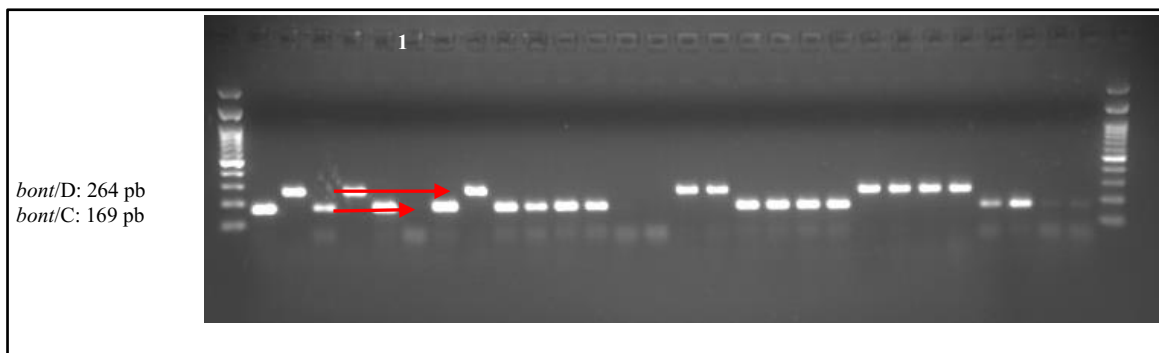


Figura 12 - Foto da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, da PCR duplex convencional com identificação dos genes de *Clostridium botulinum* tipos C e D.

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Notas:

Canaletas 1 e 30: padrão de tamanho molecular 100 bp DNA ladder.

Demais canaletas: amplicons de 169 pares de base (pb) equivalentes ao *bont/C* e de 264 pb equivalentes ao *bont/D*.

A PCR duplex convencional utilizada foi desenvolvida para detectar a cadeia leve do gene *bont* dos tipos C e D. No caso dos tipos mosaicos, a parte catalítica da BoNT, responsável pela atividade tóxica, é conservada entre o tipo C e o mosaico C/D; e entre o tipo D e o mosaico D/C. Dessa forma, essa PCR não consegue fazer a distinção entre essas duplas, não sendo possível fazer a identificação entre *Clostridium botulinum* típicos C e D e os mosaicos.

Tal fato nos levou a utilizar outra técnica de tipificação, baseada em PCR em tempo real, conforme descrito por Woudstra *et al.* (2012) e Woudstra *et al.* (2018), que permitiu a detecção e identificação específica de tipos mosaicos e não-mosaicos, e de genes de outras toxinas presentes em elementos genéticos móveis.

O limite de detecção estabelecido para este método variou de 15 a 40 cópias do genoma, com eficiência de 94,40 a 114,74%. A validação mostrou uma forte correlação linear ($R^2 > 0,99$) entre os valores de C_T (*threshold cycle*) e a concentração ao longo de um intervalo de 6 ordens de grandeza. Os valores de C_T variaram de 35,16 a 18,14 (Woudstra *et al.*, 2012).

A Tabela 9 apresenta os resultados comparativos da tipificação realizada pelos dois métodos para 14 amostras de *Clostridium botulinum* do Grupo III. Os resultados mostraram que para cinco amostras (1274, 1275, 1276, 1277 e CP05), a tipificação atribuída através da PCR duplex convencional (Prévot *et al.*, 2007) foi diferente do tipo D/C confirmado na PCR proposta por Woudstra *et al.* (2012). Para as demais amostras, a tipificação obtida pelos dois métodos foi congruente.

A tipificação inicial das amostras 1274 e 1276 como tipos C na PCR duplex convencional e a confirmação posterior como tipo mosaico D/C na PCR em tempo real, não seria esperado, visto que teoricamente não deveria haver resultados cruzados entre os tipos C e D/C. Isso foi confirmado por análises de bioinformática comparativas entre sequências de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D/C, as quais não indicaram a presença de reações inespecíficas.

Já os resultados obtidos para as amostras 1275, 1277 e CP05, inicialmente tipificadas como tipo D e posteriormente confirmadas como tipo D/C, podem ser explicados, visto que a cadeia leve da BoNT é conservada entre esses dois tipos, o que pode levar a reações cruzadas na PCR.

Tabela 9 - Resultados comparativos da tipificação realizada por PCR duplex convencional¹ e por PCR em tempo real⁴ das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Amostra	Tipo inicial ¹	NTNH ⁻²	Valores de Ct					Tipo confirmado ⁴
			CI ³	CIII ³	DI ³	DIII ³	DC ³	
1272	C	24,2	25,9	23,9	0,0	0,0	0,0	C
1274	C	15,2	0,0	16,0	17,1	0,0	20,1	DC
1275	D	16,2	0,0	16,4	16,4	0,0	20,1	DC
1276	C	13,9	0,0	15,4	16,1	0,0	19,3	DC
1277	D	31,0	0,0	29,6	30,1	0,0	33,9	DC
CP05	D	20,4	0,0	20,6	21,9	0,0	25,4	DC
CP07	C	26,0	29,3	27,6	0,0	0,0	0,0	C
CBC 02	C	15,45	15,65	14,37	0,0	0,0	0,0	C
CBD 09	D	16,05	0,0	0,0	16,24	17,89	0,0	D
CB 03/18	C	16,32	15,44	14,78	0,0	0,0	0,0	C
CB 04/18	D	16,08	0,0	0,0	16,24	15,40	0,0	D
CB 05/18	C	16,84	16,58	16,11	0,0	0,0	0,0	C
CB 07/18	C	14,37	14,62	14,12	0,0	0,0	0,0	C
CB 08/18	D	15,17	0,0	0,0	15,96	15,65	0,0	D

¹ Determinado por PCR duplex convencional adaptado de Prévot *et al.*, 2007

² Primer descrito em Nakamura *et al.*, 2013

³ Primers descritos em Woudstra *et al.*, 2012

⁴ Determinado por PCR em tempo real conforme Woudstra *et al.*, 2012

Na PCR em tempo real, o conjunto de *primers* e sondas CI, C-II, DI e D-II foram projetados nas sequências gênicas que codificam para as cadeias leves; C-III e D-III para as cadeias pesadas e DC, especificamente para o mosaico DC. Com estes oligonucleotídeos foi possível identificar tanto as partes N-terminais como C-terminais dos genes *bont/C* e *bont/D*, o que permitiu a detecção e identificação específica de tipos mosaicos e não-mosaicos.

Em relação à origem das amostras analisadas, observou-se que para as estirpes utilizadas pelo LFDA-MG (CBC 02 e CBD 09), ficou confirmada a identificação inicialmente atribuída a essas amostras, ou seja, tipos C e D, respectivamente. O mesmo foi observado para as estirpes (CB 03/18, CB 04/18, CB 05/18, CB 07/18 e CB 08/18) fornecidas por indústrias veterinárias (IND 001, 002 e 003), e que segundo informado, são empregadas na produção de suas respectivas vacinas comerciais. Já a análise de amostras adicionais (estirpes 1272, 1274, 1275, 1276, 1277, CP05 e CP07), pertencentes a uma indústria veterinária (IND 001), tiveram tipificação diferente da inicialmente sugerida, exceto pelas estirpes 1272 e CP05, as quais foram confirmadas como tipo C.

Em surtos de botulismo, os veterinários precisam identificar rapidamente a natureza da toxina a fim de tomar as medidas adequadas. Adicionalmente, como a atividade tóxica não é equivalente entre as diferentes BoNT, a sua tipificação é de grande importância, especialmente no caso de terapias com antitoxinas (Nakamura *et al.*, 2010; Rossetto *et al.*, 2006). O bioensaio

em camundongos é usado para demonstrar a presença de BoNT em amostras clínicas e para identificar o tipo de toxina, mas um resultado negativo não exclui a possibilidade de botulismo, uma vez que a toxina pode rapidamente se ligar a seus receptores na célula alvo. Outra desvantagem desse método sorológico, é que pode ocorrer neutralização cruzada entre os tipos C, D e mosaicos. Portanto, é recomendável que a detecção e tipificação de estirpes de *Clostridium botulinum* sejam baseadas não apenas na produção da BoNT propriamente dita, mas também na presença e na identificação do *locus bont*.

No entanto, a aplicação de métodos de detecção molecular rápida (Woudstra *et al.*, 2015; Woudstra *et al.*, 2012) em testes de estirpes de diferentes origens revelaram, uma similaridade genética marcante, e conseqüentemente um nível de discriminação insuficiente para caracterizar e/ou diferenciar estirpes geneticamente muito próximas. O sequenciamento de nova geração (NGS) tem se tornado uma técnica robusta para caracterizar e investigar genomas completos de bactérias, gerando informações relevantes que podem ser utilizadas em investigações epidemiológicas. Uma caracterização genômica também se torna muito importante, e até mesmo essencial, quando o objetivo consiste em estabelecer estirpes como materiais de referência.

4.3.2.2 Identificação de elementos genéticos móveis

Foram realizadas sete análises por PCR em tempo real (Woudstra *et al.*, 2018), visando identificar genes de toxinas presentes em elementos genéticos móveis, com o objetivo de melhor caracterizar estirpes de *Clostridium botulinum* grupo III. As amostras analisadas continham entre 16 e 69 ng/uL de DNA, quantificado no Qubit (Thermo Fisher Scientific).

O DNA genômico extraído das estirpes do *Clostridium botulinum* grupo III apresentou diferentes perfis, dependendo da presença (+) ou ausência (-) dos marcadores genéticos investigados. Conforme indicado na Tabela 10, estirpes do tipo C e D continham apenas p3. Todas as estirpes do tipo D/C foram negativas para as análises de p2 a p6. Isto pode ser explicado pela ausência dos marcadores testados ou por seqüências discrepantes nas regiões de ligação do iniciador e das sondas testadas, os quais foram projetados com base na seqüência de estirpe do tipo C/D.

Os resultados encontrados estão concordantes com os obtidos por Woudstra *et al.* (2018) ao pesquisar esses mesmos elementos genéticos móveis em 110 estirpes de *Clostridium botulinum* e em 519 amostras coletadas em surtos de botulismo na Europa.

Pesquisas sugerem que o plasmidoma seja um dos principais contribuintes para a diversidade genética de *Clostridium botulinum* do grupo III, podendo inclusive auxiliar na diferenciação entre isolados envolvidos em diferentes surtos (Woudstra *et al.* 2016; Skarin, 2015; Skarin *et al.*, 2011).

Informações sobre os elementos genéticos móveis também podem incentivar estudos futuros sobre o papel dessas toxinas no mecanismo de patogenicidade do *Clostridium botulinum* do grupo III e em possíveis adaptações ao hospedeiro. Para tal, é importante conhecer algumas características já descritas para as toxinas codificadas pelos elementos genéticos pesquisados. A toxina C2 catalisa a ribosilação de ADP de actina, o que leva à redistribuição do citoesqueleto e à despolimerização da actina, resultando no arredondamento das células (Wiegers *et al.*, 1991). A toxina correspondente no *Clostridium difficile* (toxina binária - CDT) é também um importante fator para a gravidade da diarreia observada (Gerding *et al.*, 2014). A alfa-toxina pertence à superfamília da aerolisina e apresenta similaridade com a alfa-toxina de *Clostridium septicum*, que possui propriedades necróticas e hemolíticas (Amimoto *et al.*, 2006). Toxina tipo-épsilon também pertence à família da aerolisina e está presente em infecções por *Clostridium perfringens*, sendo responsável pela enterite hemorrágica (Stiles *et al.*, 2013).

Tabela 10 - Perfil da presença (+) ou ausência (-) dos marcadores genéticos investigados nas estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, PCR em tempo real*

Estirpe	Tipo	p2 alphatox	p3 C2-I	p3 C2-II	p4 hyptox	p5 epsilonI	p5 epsilonII	p6 bacteriocin
1272	C	-	+	+	-	-	-	-
CP07	C	-	+	+	-	-	-	-
CBC 02	C	-	+	+	-	-	-	-
CB 03/18	C	-	+	+	-	-	-	-
CB 05/18	C	-	+	+	-	-	-	-
CB 07/18	C	-	+	+	-	-	-	-
CBD 09	D	-	+	+	-	-	-	-
CB 04/18	D	-	+	+	-	-	-	-
CB 08/18	D	-	+	+	-	-	-	-
1274	DC	-	-	-	-	-	-	-
1275	DC	-	-	-	-	-	-	-
1276	DC	-	-	-	-	-	-	-
1277	DC	-	-	-	-	-	-	-
CP05	DC	-	-	-	-	-	-	-

*PCR em tempo real conforme descrito por Woudstra *et al.*, 2018

Adicionalmente, análises mais abrangentes de fago, plasmídeo, CRISPR e conteúdo SNP (*single nucleotide polymorphism*) mostraram potencialidade para serem usadas como ferramentas de diferenciação e caracterização de estirpes de *Clostridium botulinum* (Woudstra *et al.* 2016; Skarin, 2015).

Neste trabalho, entende-se que informações relacionadas aos elementos genéticos móveis podem ser utilizadas na caracterização das estirpes como materiais de referência. Nesse contexto, podem também servir como instrumento de monitoramento da estabilidade do material, em relação à manutenção de fagos, tanto durante o seu armazenamento quanto após procedimentos de manipulação em laboratório.

4.3.3 Sequenciamento genômico

Foi realizado sequenciamento genômico das estirpes 1274, 1275, 1276, 1277, CP05, CBC 02, CBD 09, CB 03/18, CB 04/18, CB 05/18, CB 07/18 e CB 08/18. Não foi possível realizar o sequenciamento das estirpes 1272 e CP07 devido à quantidade insuficiente de DNA, menor que 2 µg.

4.3.3.1 Sequenciamento genômico das estirpes D/C

Após sequenciamento genômico das estirpes 1274, 1275, 1276, 1277 e CP05, os dados brutos foram cortados (comprimento mínimo de 35 pb; índice de qualidade de 0,03) e as sequências montadas pela primeira vez (comprimento mínimo da *contig* de 1.000 pb), produzindo 105 a 190 contigs. Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que a profundidade de leitura média das montagens variou de 30x para as estirpes 1275 e 1276 a 450x para a estirpe 1274, com valores de N₅₀ entre 34 kpb e 47 kpb.

O tamanho médio dos genomas foi de 2,84 Mb, com 2,57 Mb sendo o menor tamanho de genoma, um conteúdo médio de G+C de 28.1% (isolado 1277) e 2,94 Mb como o maior

tamanho de genoma (isolado 1274 e 1275). Em média, 2.554 sequências codificadoras foram identificadas nos genomas. As sequências anotadas do genoma completo *draft* destas estirpes de *Clostridium botulinum* do grupo III foram as primeiras do Brasil, e da América do Sul, depositadas em DDBJ/ENA/GenBank. Os números de acesso estão listados na Tabela 11.

Tabela 11 – Origem e informações sobre sequências genômicas *draft* de estirpes de *Clostridium botulinum* tipo D/C brasileiras sequenciadas

Isolado	1274	1275	1276	1277	CP05
Origem	Indústria veterinária	Indústria veterinária	Indústria veterinária	Indústria veterinária	Indústria veterinária
Tipo	D/C	D/C	D/C	D/C	D/C
Nº de contigs	122	131	127	105	190
Tamanho genoma (Mbp)	2,94	2,94	2,91	2,57	2,88
G + C (%)	28,0	27,9	27,9	28,1	28,0
N50 (kbp)	43,278	40,516	47,330	40,321	34,348
Profundidade de leitura média	450	30	30	50	200
Nº de sequências codificadoras (por PGAAP)	2.648	2.642	2.634	2.311	2.567
Nº acesso NCBI	MVIY000000000	MVIZ000000000	MVJA000000000	MVJB000000000	MVJC000000000
Nº acesso SRA	SRR5239628	SRR5239627	SRR5239626	SRR5239625	SRR5239624

As estirpes D/C sequenciadas parecem similares entre si, exceto pela estirpe 1277 cujo genoma é um pouco menor. Na Figura 13 está apresentado um mapa de calor (Gegenees) obtido por comparação dos genomas das estirpes 1274, 1275, 1276 e 1277 (procedência IND 001) com genomas publicados de outras estirpes do Grupo III e de outros Clostrídios. As amostras D/C formam um *cluster* com outras do tipo D/C, o que reforça a teoria de propagação clonal.

Analisando as sequências genômicas das estirpes 1277 e CP05 por bioinformática, não foi possível localizar o gene *bont*, responsável pela codificação da BoNT. Isso pode ser resultado de uma cobertura incompleta do genoma ou mesmo da perda de alguma parte (por exemplo, fago), durante as manipulações da amostra para o sequenciamento. Isso também pode explicar o fato do tamanho do genoma dessas duas estirpes ter sido um pouco menor que o das demais estirpes sequenciadas.

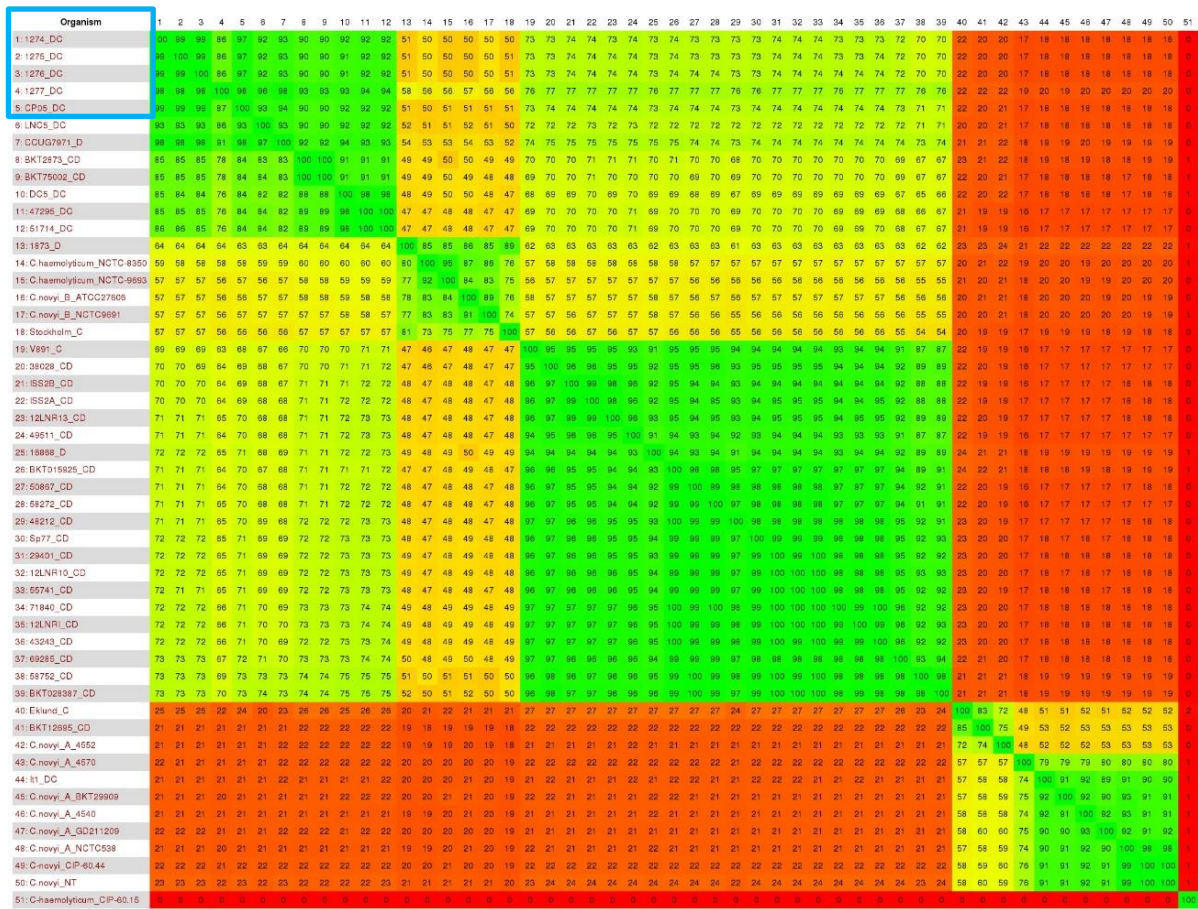


Figura 13 - Mapa de calor gerado pelo programa *Gegenes*, comparando genomas das estirpes 1274, 1275, 1276 e 1277 (seleção em azul) com genomas publicados de outras estirpes de Clostrídios

4.3.3.2 Sequenciamento genômico das estirpes CBC 02 (*Clostridium botulinum* tipo C) e CBD 09 (*Clostridium botulinum* tipo D)

Sequenciamentos genômicos das estirpes CBC 02 (tipo C) e CBD 09 (tipo D), ambas procedentes do LFDA-MG, foram realizados no Aquacen e na Faculdade de Veterinária da Universidade de Helsinki. Os resultados de sequenciamento da *locus bont* mostrou que estes são muito similares ao de outras estirpes do Grupo III.

Comparando-se a sequência de nucleotídeos do gene *bont* da estirpe CBC 02, observou-se que esse é 100% idêntico ao da estirpe D6F (tipo C), com 100% cobertura e 100% identidade, e muito próximo ao das estirpes tipo C CB-19, 571, 573 e C-Stockholm, com 100% cobertura e 99,97% identidade.

Já para o gene *bont* da estirpe CBD 09, observou-se que esta é estreitamente relacionada a estirpe 1873 (tipo D), com 100% de identidade e 99% de cobertura.

Um desenho esquemático do complexo de proteínas codificado pelo *locus* da toxina botulínica das estirpes CBC 02 (tipo C) e CBD 09 (tipo D) está apresentado na Figura 14, pelos *contig* 11 (NODE_11) e *contig* 6, respectivamente, com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT) proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*).

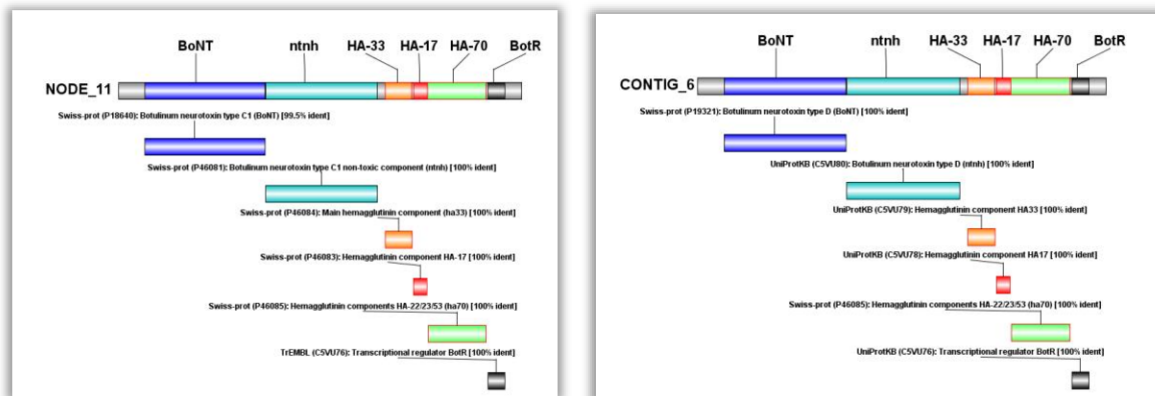


Figura 14 – Complexo de proteínas das estirpes CBC 02 (tipo C) e CBD 09 (tipo D) com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT), proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*)

Fonte: Laboratório Aquacen – EV/UFGM

Os genes da neurotoxina e das proteínas não-tóxicas associadas estão agrupados em estreita proximidade e constituem o *locus* da toxina botulínica (*bont gene cluster*). O gene *bont* e o gene do componente NTNH formam um *operon* localizado na extremidade 3' do *locus* da toxina botulínica, o qual é bem conservado nos diferentes tipos de clostrídios produtores de BoNT. Os genes *ha* são transcritos na orientação oposta e formam um segundo *operon*. Os genes *bont* e *ntnha* estão bem próximos aos genes que codificam para os produtos protéicos do *operon* hemaglutinina (que são HA17, HA33 e HA70). As hemaglutininas interagem com o heterodímero BoNT-NTNHA formando grandes grandes oligômeros conhecidos como toxinas progenitoras (PTX) ou complexos de toxina. Um gene *botR*, o qual codifica para um fator sigma alternativo envolvido na regulação da expressão gênica do *locus* da toxina botulínica também está presente (Rossetto *et al.*, 2014; Popoff; Bouvet, 2013).

4.3.3.3 Sequenciamento genômico das estirpes utilizadas em vacinas veterinárias

Comparando-se a sequência de nucleotídeos do gene *bont* das estirpes CB 05/18 (tipo C, procedência IND 001) e CB 07/18 (tipo C, procedência IND 003), observou-se que são 100% idênticas ao da estirpe D6F (Tipo C), com 100% cobertura e 100% identidade, e muito próximas às das estirpes tipo C CB-19, 571, 573 e C-Stockholm, com 100% cobertura e 99% identidade. Mesmas características observadas na estirpe CBC 02 (tipo C, procedência LFDA-MG).

Comparando-se a sequência de nucleotídeos do gene *bont* das estirpes CB 04/18 (tipo D, procedência IND 002) e CB 08/18 (tipo D, procedência IND 003), observou-se identidade de 100% com a estirpe 1873 (tipo D), com 99% cobertura e 99% identidade com a estirpe CB16 (tipo D), com 100% cobertura.

4.3.4 Comparações

Pesquisas anteriores confirmaram similaridade marcante entre as sequências genômicas para estirpes de um mesmo tipo, do Grupo III de *Clostridium botulinum*, impossibilitando inclusive estabelecer correlação entre a origem geográfica e a fonte das estirpes. Porém, uma das particularidades dos fagos do *Clostridium botulinum* do grupo III é que eles estão presentes em um estado lisogênico instável, e podem ser facilmente perdidos durante o cultivo em

laboratório. Os fatores envolvidos na instabilidade do fago são desconhecidos (Woudstra *et al.*, 2018; Oguma *et al.*, 1976). Traços de sequências de inserção no *cluster bont*, em combinação com o menor tamanho do genoma, também foram indicados como fatores de pressão para possíveis alterações na codificação da BoNT (Skarin, 2015).

Nesse sentido, é importante verificar a manutenção do gene *bont* em estirpes de referência utilizadas rotineiramente na produção de vacinas, assim como verificar a homogeneidade entre as proteínas codificadas por eles.

Uma árvore filogenética foi construída a partir de sequências de aminoácidos do gene *bont* de estirpes utilizadas nesse trabalho e sequências de referência coletadas no GenBank (NCBI), apresentadas na Tabela 8 com suas respectivas denominações. Observa-se pela Figura 15, que houve um agrupamento coerente das estirpes sequenciadas neste trabalho, com amostras de referência dos mesmos tipos de *Clostridium botulinum* do Grupo III (ou seja, C, D, C/D e D/C).

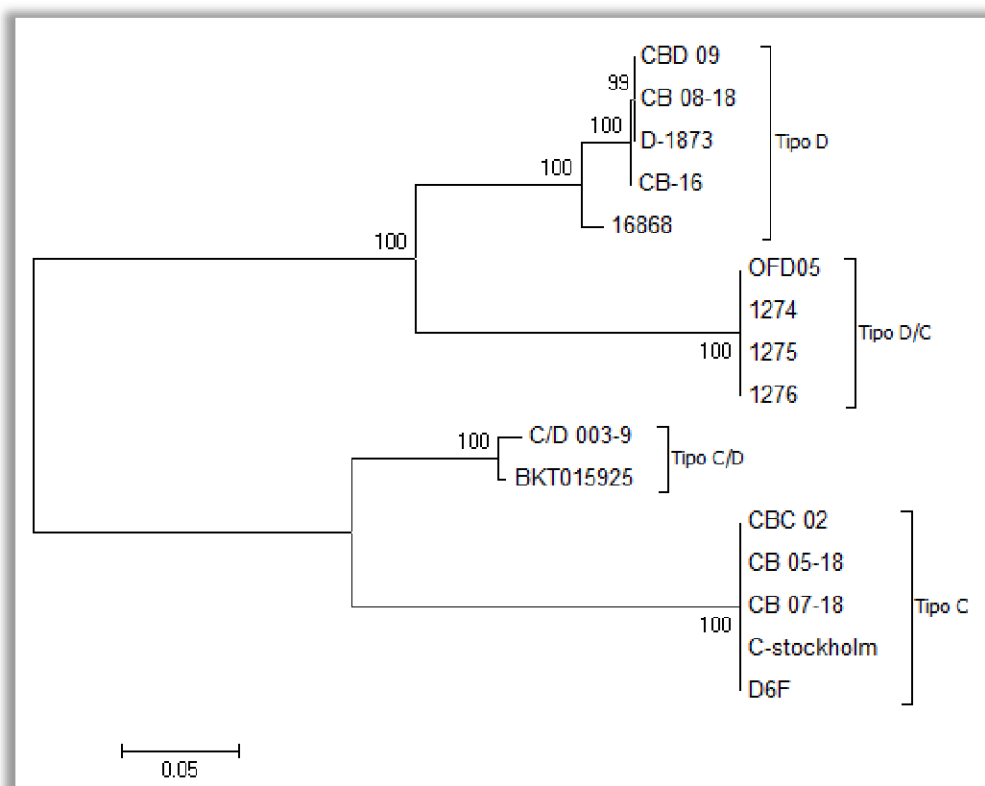


Figura 15 – Árvore filogenética, incluindo estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C, D, C/D e D/C, construída no programa MEGA 6.06, utilizando o modelo de Neighbor Joining com 1000 réplicas de *bootstrap*, e modelo de substituição de aminoácidos DayHoff

4.3.5 Impactos na produção de vacinas anti-botulínicas de uso veterinário no Brasil

Com os resultados de tipificação associados aos dados de sequenciamento genômico das estirpes utilizadas por três indústrias veterinárias brasileiras, confirmou-se de forma inequívoca, pelo menos nesses casos, que a identidade das estirpes corresponde aos tipos de toxinas botulínicas, ou seja, C e D, contidos em suas respectivas vacinas, demonstrando coerência ao recomendado no Regulamento Técnico para Produção, Controle e Emprego de Vacinas Contra

o Botulismo (Brasil, 2002).

No entanto, estudos mais recentes que ampliaram o conhecimento a respeito da natureza antigênica das BoNTs C, D, e dos seus mosaicos C/D e D/C, trouxeram questionamentos e desafios relacionados à composição desejável para vacinas anti-botulínicas.

Sabe-se que pequenas variações na sequência de aminoácidos de toxinas, podem levar a diferenças marcantes de atividade quando ocorrem em sítios estratégicos, e essas diferenças podem afetar a ligação e neutralização de anticorpos monoclonais e policlonais (Hill *et al.*, 2007). Além disso, mecanismos recentemente estudados sobre ligação das BoNTs e seus respectivos receptores ou locais de ligação, sugerem que pode não haver uma proteção cruzada entre diferentes tipos e subtipos. No caso das BoNT/C e BoNT/D, foi demonstrado que as ligações destas ao gangliosídeo parecem ser mais complexas do que as desvendadas até o momento para outros sorotipos. Em primeiro lugar, elas não possuem o sítio de ligação ao gangliosídeo (GBS) conservado. Porém, na mesma área das proteínas, foram observados sítios análogos, que se ligam a gangliosídeos, sugerindo um modelo de ligação distinto (Berntsson *et al.*, 2013). Também foi sugerido que a BoNT/C pode não precisar de um receptor de proteína (Tsukamoto *et al.*, 2005), podendo se ligar aos neurônios através de múltiplos gangliosídeos (Strotmeier *et al.*, 2011; Karalewitz *et al.*, 2010). A entrada de BoNT/DC nos neurônios, por sua vez, não é bloqueada pela competição com BoNT/C ou BoNT/D, indicando que diferentes receptores para esses três sorotipos são utilizados na ligação à membrana (Nakamura *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2012), podendo o mosaico D/C, inclusive, se ligar a três receptores na membrana neuronal (Berntsson *et al.*, 2013).

Toda essa diversidade de ligação das BoNTs do *Clostridium botulinum* do Grupo III, leva a uma discussão sobre a composição das vacinas anti-botulínicas de uso veterinário produzidas no Brasil. Idealmente, uma vacina anti-botulínica deveria possuir componentes que permitissem o desenvolvimento de uma resposta imunológica satisfatória contra todos os tipos circulantes (incluindo os mosaicos, quando pertinente). No entanto, o Brasil não dispõe atualmente de dados epidemiológicos da ocorrência de *Clostridium botulinum* do Grupo III, com uma tipificação que inclua os mosaicos. Nem mesmo métodos de diagnóstico para essa tipificação estão disponíveis nos laboratórios de análise nacionais. Diante dessa realidade, e partindo do princípio da precaução, as vacinas multivalentes deveriam, então, trazerem em sua composição, componentes que garantissem proteção contra todos os tipos, mosaicos e não mosaicos.

Mais especificamente em relação a vacinas anti-botulínicas para uso em ruminantes, talvez o único tipo que poderia ser dispensado da composição seria o mosaico C/D, visto que, conforme descrito na literatura, este está mais associado a surtos em aves e não em ruminantes. Por outro lado, a inclusão do mosaico D/C (que atualmente não faz parte da composição das vacinas anti-botulínicas em uso no Brasil), seria extremamente recomendável. As toxinas do mosaico D/C possuem variação da sequência de aminoácidos na porção H_C, que diverge significativamente de qualquer uma das BoNT parentais (Webb *et al.*, 2007). Além disso, BoNT/DC é um agente altamente tóxico para bovinos (Nakamura *et al.*, 2010). Em um teste com vacinas recombinantes produzidas com o domínio H_C de BoNT para os sorotipos C e D na levedura *Pichia pastoris*, os camundongos sobreviveram aos desafios de todas as toxinas, exceto ao da toxina D/C (Webb *et al.*, 2007).

Atualmente não há evidências que o programa de controle contra o botulismo esteja ameaçado, visto que surtos esporádicos relatados nos últimos anos foram associados a protocolos de vacinação inexistentes ou inadequados (Guizelini *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2016).

No entanto, com a globalização, sempre existe o risco da introdução de novos agentes, e se os mecanismos de controle e prevenção disponíveis não forem suficientes para combatê-los, uma doença antes controlada, pode reemergir.

4.4. Conclusão

Com a utilização de métodos microbiológicos clássicos, técnicas moleculares e sequenciamento genômico foi possível tipificar e caracterizar amostras de *Clostridium botulinum* dos tipos C, D e D/C mantidas atualmente por indústrias veterinárias e pelo órgão regulador.

A PCR duplex convencional, adaptada de Prévot *et al.* (2007), foi insuficiente para acessar uma tipificação completa das estirpes, pois não permitiu distinguir os tipos mosaicos, não sendo recomendada para uso neste trabalho. Tipificação adequada, incluindo os tipos mosaicos, foi obtida pela PCR em tempo real proposta por Woudstra *et al.* (2012).

A partir dos dados de sequenciamento genômico foi possível estabelecer comparações genômicas entre as estirpes testadas com outras cujas sequências encontravam-se disponíveis no GenBank (NCBI), avaliando o gene que codifica a BoNT, genes de proteínas acessórias e elementos genéticos móveis.

Com os resultados da caracterização genômica das estirpes CBC 02 (tipo C) e CBD 09 (tipo D) foi possível atribuir a rastreabilidade necessária para seu uso na produção de toxinas botulínicas tipos C e D.

Além disso, os estudos genômicos realizados permitiram conhecer, de forma inédita, características de estirpes de *Clostridium botulinum* do Grupo III, provenientes da América do Sul, e compará-las com estirpes de outros locais do mundo, o que resultou na produção das duas publicações listadas abaixo e inseridas no Anexo 1:

WOUDSTRA, C.; BRITO, R. B.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; SILVA, R. O. S.; LOBATO, F. C. F.; FACH, P. Draft genome sequences of five brazilian *Clostridium botulinum* Group III type D/C strains. **Genome Announcements**, v.5, n.20, 2017.

WOUDSTRA, C.; LE MARECHAL, C.; SOUILLARD, R. ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; BANO, L.; BAYON-AUBOYER, M. H.; KOENE, M.; MERMOUD, I.; BRITO, R. B.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S.; DORNER, M.B.; FACH, P. Investigation of *Clostridium botulinum* group III's mobilome contente, **Anaerobe**, v.49, p.71-77, 2018.

Por fim, foi apontado que a variabilidade antigênica observada entre *Clostridium botulinum* tipos C, D e seus mosaicos exige novas orientações a respeito da modelagem das vacinas anti-botulínicas de uso veterinário, assim como dos regulamentos técnicos associados. Utilizar e ampliar o conhecimento sobre estrutura-função dessas BoNTs, ampliar métodos diagnósticos que permitam alcançar a tipificação de mosaicos em surtos de botulismo e realizar levantamentos epidemiológicos são essenciais para garantir a manutenção do controle da doença no país.

4.5. Perspectivas futuras

Implantar em laboratórios nacionais, métodos diagnósticos que permitam alcançar a tipificação de *Clostridium botulinum* mosaicos.

Realizar levantamentos epidemiológicos de ocorrência de *Clostridium botulinum* do Grupo III no país, com tipificação incluindo seus mosaicos.

Apresentar ao órgão regulamentador (MAPA) os resultados e discussões decorrentes dos estudos realizados nessa tese.

5. CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE TOXINAS E ANTITOXINAS BOTULÍNICAS

5.1. Introdução

A variabilidade associada à maioria dos estudos de avaliação biológica é relativamente grande e, portanto, controles internos são frequentemente empregados para garantir que os resultados sejam confiáveis. O uso regular de materiais de referência (MR) garante a precisão e a repetibilidade dos métodos empregados e por isso, agências reguladoras e organismos de acreditação reforçam a necessidade do seu uso.

Tanto no controle oficial de vacinas contra o botulismo, quanto na produção e controle de qualidade destes produtos pelas indústrias farmacêuticas veterinárias, as toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D são insumos essenciais e, ao serem utilizados como MR, devem apresentar o mais elevado padrão de qualidade. Esses insumos também são essenciais para o diagnóstico de casos suspeitos de botulismo animal, além de serem muito importantes na validação de novos métodos de ensaio, especialmente alternativos ao bioensaio.

Porém, um grande gargalo enfrentado por grupos de pesquisa, laboratórios para diagnóstico, indústrias produtoras de vacinas e o órgão oficial (MAPA) é a dependência da importação de materiais de referência, como toxinas e antitoxinas, ou mesmo a indisponibilidade destes no mercado, o que representa um empecilho para o bom andamento das pesquisas e implementação de testes alternativos.

O objetivo específico da etapa descrita nesse capítulo foi produzir toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D, e verificar seu potencial como materiais de referência certificados (MRCs). A produção das toxinas botulínicas envolveu etapas de crescimento de estirpe de referência, concentração, filtração e posterior liofilização. A obtenção das antitoxinas iniciou-se pelo processo de produção dos toxóides botulínicos inativados, de imunização de carneiros, sangria para obtenção do plasma, precipitação dos anticorpos, diálise e liofilização.

Os produtos que obtiveram rendimento e resultados satisfatórios de controle de qualidade foram encaminhados para estudos de certificação como MRCs.

5.2. Material e métodos

5.2.1 Local de realização do experimento

Os experimentos relacionados à produção e caracterização de toxinas e antitoxinas botulínicas foram realizados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG e no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado em Belo Horizonte/MG.

5.2.2 Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

A estirpe de *Clostridium botulinum* tipo C, CBC 02, foi utilizada para a produção da toxina botulínica tipo C, e a estirpe de *Clostridium botulinum* tipo D, CBD 09, para a produção da toxina botulínica tipo D.

A opção por estas estirpes teve como base os resultados satisfatórios de crescimento; pureza e confirmação da sua identidade (gênero, espécie e tipo) apresentados no Capítulo 1. Além disso, a escolha também levou em conta o fato destas estirpes já pertencerem ao banco de referência do LFDA-MG, que é o laboratório oficial do MAPA designado para a produção de

insumos veterinários, utilizados como padrões de referência no controle de botulismo no Brasil.

5.2.3 Animais utilizados

Para testes de atividade biológica das toxinas, antitoxinas e toxóides botulínicos tipos C e D foram utilizados camundongos de ambos os sexos da raça *Swiss*, linhagem *Webster*, com peso variando entre 18 a 22 g, fornecidos pela Unidade de Experimentação Animal do LFDA-MG.

Foram utilizados cobaios (*Cavia porcellus*) da linhagem *English Short Ear*, de ambos os sexos, pesando entre 350 e 500 g, fornecidos pelo LFDA-MG, para teste de inocuidade dos toxóides, segundo Instrução Normativa nº 23 (Brasil, 2002).

Para a produção das antitoxinas foram utilizados carneiros, da raça Santa Inês, machos adultos, pesando entre 40 e 50 kg, saudáveis e de boa constituição física, mantidos em apriscos, com água *ad libidum*, ração e feno à vontade.

Os animais utilizados neste projeto foram tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal (CEUA protocolo 214/2016).

5.2.4 Padrões de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D utilizadas nos testes

Foram utilizados padrões de antitoxinas botulínicas tipo C (Lote 01/1995) e tipo D (Lotes 01/2010 e 02/2017) e de toxinas botulínicas tipo C (Lote 01/2011) e tipo D (Lote 02/2007), fornecidos pelo MAPA para estudos comparativos e de certificação dos insumos produzidos.

Foram utilizados também padrões de antitoxinas botulínicas tipo C (*Non WHO Reference Material Botulinum type C antitoxin, equine NIBSC code: 01/508*) e tipo D (*WHO International Standard Botulinum type D antitoxin, 1st International Standard NIBSC code: 61/001*) fornecidos pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) para estudos comparativos.

5.2.5 Produção das toxinas

As toxinas botulínicas tipos C e D foram produzidas conforme procedimento desenvolvido pelo LFDA/MG, adaptado de Moura (2011), e descrito no POP/PMR/PL/008 V.1 (LANAGRO, 2014a) envolvendo etapas de: crescimento de estirpe de *Clostridium botulinum* em meio nutriente, concentração, filtração e posterior liofilização em alíquotas de 1 mL (Figura 16).

Os processos de produção foram conduzidos atendendo princípios de Boas Práticas de Fabricação, e seguindo requisitos do Sistema de Gestão da Qualidade e de Biossegurança.

5.2.5.1 Produção do inóculo

Um frasco da estirpe selecionada para a produção de toxina foi reconstituído com 2 mL de meio de cultura *Reinforced Clostridium Medium* (RCM) e esse volume foi transferido para dois tubos de ensaio com tampa rosca contendo 20 mL do mesmo meio. Os tubos foram incubados a 37°C, em jarra de anaerobiose de 3L (Oxoid) contendo sachê gerador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid), por 24 horas. Após esse tempo, e tendo constatado crescimento pela formação de precipitado e gás, o conteúdo dos tubos foi vertido em um frasco de vidro com tampa de rosca contendo 500 mL do meio RCM, que foi incubado nas mesmas

condições descritas e utilizado como inóculo no fermentador. As transferências de conteúdo foram realizadas de forma asséptica, a fim de evitar possíveis contaminações.

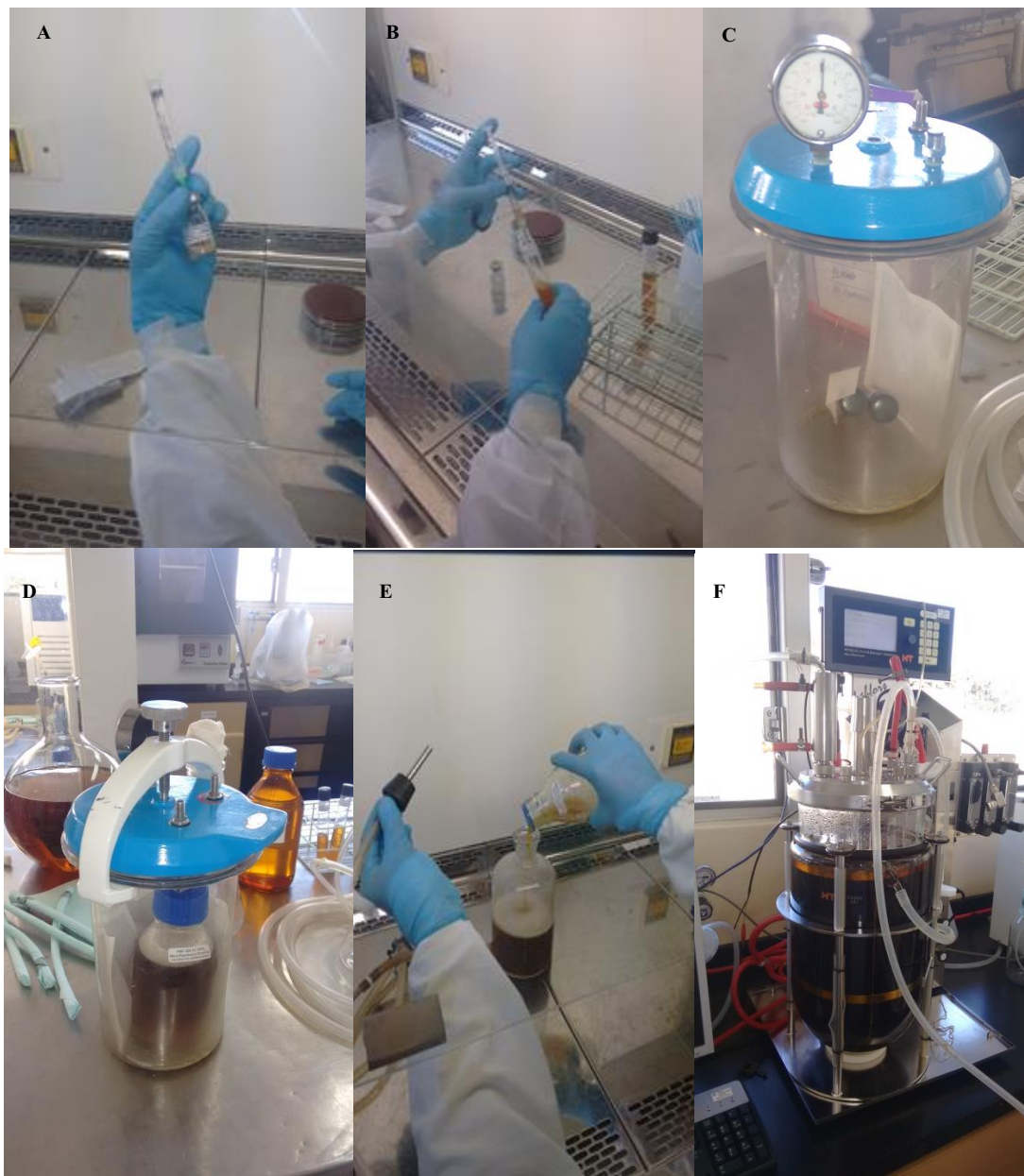


Figura 16 – Etapas da produção das toxinas botulínicas tipos C e D: reconstituição da estirpe liofilizada (A), crescimento em meios de cultura *Reinforced Clostridium Medium* (B), incubação em jarra de anaerobiose (C), crescimento em maior volume de meio de cultura RCM (D), transferência asséptica do pré-cultivo para o fermentador (E), fermentação em biorreator (Infors HD Labfors 3) com meio nutriente (F)

Fonte: Arquivo pessoal, 2016-17

5.2.5.2 Fermentação

A fermentação foi conduzida utilizando um biorreator de bancada (Infors HD Labfors 3)

com volume da dorna de 13 L, controle de velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio, o qual permitiu manter uma atmosfera anaeróbia durante o processo. O equipamento possuía também um sistema automático de controle de temperatura e pH.

O meio de produção foi o meio nutriente (adaptado de Mozzer, 2004), composto por 4% proteose de peptona nº 3, 2% digerido pancreático de caseína, 2% extrato de levedura, 1% dextrose, 0,5% cloreto de sódio, 0,003% sulfato de magnésio, 0,03% L-cisteína, pH 7,2 a 7,4. O meio foi esterilizado por filtração em membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) com poro de 0,22 µm.

O inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) do volume total de meio de cultura para o cultivo. A fermentação foi conduzida em biorreator, a 37°C, por aproximadamente 24 horas, com correção automática do pH para evitar que abaixasse além de 7,0, agitação na velocidade mínima (75 rpm) e injeção de nitrogênio na área livre da dorna (*headspace*).

O fim da fermentação foi determinado pela interrupção da utilização da solução de NaOH para correção do pH, indicando cessação do crescimento bacteriano pela exaustão nutricional do meio.

Ao final da fermentação, para verificar a qualidade do cultivo e a viabilidade da continuidade do processo, foi retirada uma amostra para avaliação de seu título (em DMM - dose mínima mortal) por bioensaio em camundongos (Solomon; Lilly, 2001).

5.2.5.3 Concentração e filtração das toxinas

Após a fermentação, as suspensões foram centrifugadas a 6.000 xg por 1 hora, em centrífuga (Evolution RC Sorvall), sob refrigeração (4°C), para separação das células. O sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF com poro de 0,22 µm e concentrado a 1/50 do volume inicial, por sistema de ultrafiltração tangencial, utilizando membranas de retenção com ponto de corte de 30 kDa Prepscale® (Millipore), com auxílio de bomba peristáltica tipo easy load® (Millipore). Após a concentração, a toxina foi esterilizada por filtração em membrana PVDF com poro de 0,22 µm.

5.2.5.4 Liofilização

A toxina concentrada e filtrada foi envasada, em alíquotas de 1 mL, em frascos para liofilização de 5 mL. O envase foi feito utilizando micropipeta de alta precisão, calibrada, em cabine de segurança biológica. Rolhas de borracha foram ajustadas na boca do frasco, e em seguida as bandejas com os frascos foram embrulhadas em papel alumínio e transferidas para o *ultrafreezer* a -80°C por 48 horas. Após este período, os frascos foram liofilizados em liofilizador de bancada (Christy, Alpha 1-4 LSCplus).

As toxinas produzidas foram mantidas a -80°C. Pelo menos dois frascos do lote de toxina liofilizada, foram separados para realização de testes de controle de qualidade incluindo testes de potência e esterilidade.

5.2.6 Avaliação e titulação das toxinas botulínicas

5.2.6.1 Teste de esterilidade

A esterilidade foi verificada pela inoculação de 0,5 mL do produto em quatro tubos contendo 20 mL de caldo tioglicolato e em quatro tubos contendo 20 mL de caldo Sabouraud. Metade dos tubos de cada um dos inóculos em caldo tioglicolato foi incubada em anaerobiose; os demais tubos com meio Sabouraud e com caldo tioglicolato foram incubados em aerobiose.

Todos os tubos inoculados foram mantidos a 37°C, por 21 dias, com observações diárias (Brasil, 2002).

5.2.6.2 Titulação das toxinas

A titulação das toxinas foi realizada pela determinação da DMM (dose mínima mortal) e do Limite de morte (L+), utilizando bioensaio em camundongos (Solomon; Lilly, 2001). A dose mínima mortal (DMM) foi definida como a menor quantidade de toxina que inoculada por via endovenosa em camundongos é capaz de matar todos os animais do grupo em 72 horas. O limite de morte (L+) foi definido como a menor quantidade de toxina que, quando misturada a 1 UI de antitoxina homóloga e inoculada por via endovenosa em camundongos é capaz de matar todos os animais do grupo em 72 horas (Onderstepoort [199?]).

Para determinação da DMM, foram preparadas diluições seriadas da toxina, por exemplo, inicialmente 1:100, 1:1000 e 1:10000. Havendo resultado de mortes compreendido entre duas das diluições testadas, novas diluições sucessivas e mais aproximadas eram testadas, até que o título estivesse compreendido dentro do menor intervalo possível, mantendo um distanciamento menor ou igual a 20% entre as diluições testadas. O título expresso em DMM corresponde à recíproca da maior diluição da toxina onde ocorreu a morte de dois camundongos inoculados.

Quando os camundongos permaneceram vivos, em todas as diluições, concluiu-se que o título estava abaixo da menor diluição testada. Ao contrário, quando foram observados resultados de morte em todas as diluições, concluiu-se que o título da toxina estava acima da maior diluição testada.

Para determinação do L+, procedeu-se da mesma forma, preparando diluições seriadas da toxina, porém adicionando antitoxina padrão homóloga, contendo 1 UI/mL. Após a mistura da toxina teste com a antitoxina padrão, em proporções iguais (0,4 mL de cada), os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 37 °C ± 1 °C por 60 minutos. Dois camundongos, pesando entre 18 e 22 g, foram inoculados, por via endovenosa, com 0,2 mL de cada mistura. Para facilitar a inoculação através da veia da cauda, os camundongos foram mantidos em caixa de aquecimento por alguns minutos e seringas descartáveis de 1 mL foram utilizadas. Os camundongos inoculados foram observados por 72 horas, e o título expresso em L+, foi igual à recíproca da maior diluição da toxina em que ocorreu morte dos dois camundongos inoculados.

Os animais exibindo sinais clínicos consistentes com a patogênese esperada da doença que eram incapazes de se levantar ou se mover de forma independente foram considerados, para fins da leitura do teste como mortos.

As toxinas foram testadas frente a padrões de referência de antitoxinas homólogas do MAPA e do NIBSC.

Ao final dos testes, os animais sobreviventes, com ou sem sintomatologia da doença, foram eutanasiados, seguindo princípios éticos de experimentação animal.

5.2.6.3 Quantificações protéicas

A concentração protéica das toxinas produzidas foi estimada pelo método do biureto (Nowotny, 1979), utilizando uma curva padrão de albumina bovina (Sigma, Fração V), nas concentrações 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,5 mg/mL; 2,0 mg/mL e 2,5 mg/mL em PBS 0,85% pH 7,2-7,4.

O reagente de biureto é composto de hidróxido de potássio (KOH), sulfato de cobre (II) (CuSO₄) e tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O). Este reagente de coloração azul torna-se violeta na presença de proteínas, devido à formação de um complexo entre o íon Cu²⁺ e

os átomos de nitrogênio das ligações peptídicas das moléculas de proteína. O tom da coloração violeta reflete a concentração protéica da amostra testada.

Os produtos testados foram diluídos a 1:50 e 1:100 com o mesmo diluente do padrão (que também foi utilizado como branco), para um volume final de 2 mL. A cada tubo com as diluições (do padrão, das amostras e branco) foram acrescentados 2,0 mL de reagente de biureto de modo a obter um volume final de 4,0 mL.

Após a adição do reagente de biureto, os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por dez minutos. As soluções foram então transferidas para cubetas de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Genesys 10 UV (Thermo Scientific, USA) no comprimento de onda de 544 nm.

A concentração protéica (CP) expressa em mg/mL foi calculada pela Equação 1:

$$CP = (\text{Densidade ótica amostra} / \text{Densidade ótica padrão}) \times \text{Conc. padrão (mg/mL)} \times \text{Fator de diluição} \quad (1)$$

5.2.6.4 Eletroforese

Eletroforese dos lotes das toxinas botulínicas tipos C e D produzidas, comparando-as com lotes de toxinas padrão do MAPA foi realizada utilizando o *kit NuPage electrophoresis system* (Thermo Fisher).

As amostras em diferentes concentrações (1:50, 1:100, 1:200 e 1:300) foram preparadas por aquecimento para uma eletroforese desnaturante, por 10 minutos a 70°C, e posterior diluição em tampão de amostra 1:2. As corridas foram realizadas em gel pré-moldado NuPAGE de Bis-Tris 4-12% (Invitrogen), aplicando-se 20 µL de amostra, por canaleta. Aplicou-se também 5 µL de marcador de peso molecular de 3,5 a 260 kDa (Invitrogen) diluído 1:10. A corrida do gel foi realizada em voltagem constante de 200v e 115 mA por 50 minutos usando Xcell SureLock MiniCell (Invitrogen). A coloração do gel foi realizada com *SilverQuest kit* (Invitrogen).

5.2.7 Produção das antitoxinas

A obtenção das antitoxinas botulínicas tipos C e D iniciou-se pelo processo de produção de toxóides botulínicos inativados por formol, conforme procedimento descrito no POP/PMR/PL/021 V.1 (LANAGRO, 2012a). Os toxóides foram inoculados em carneiros conforme procedimento desenvolvido pelo LFDA/MG, adaptado de Parreiras (2001), e descrito no POP/PMR/PL/022 V.1 (LANAGRO, 2012b). Com o plasma obtido foram realizadas etapas de precipitação e diálise, conforme descrito no POP/PMR/PL/010 (LANAGRO, 2015) e por fim, liofilização do produto final.

5.2.7.1 Produção dos toxóides

Dois toxóides monovalentes foram produzidos, a partir da toxina botulínica do tipo C e da toxina botulínica do tipo D, ambas com títulos previamente determinados. As toxinas foram diluídas a 1:5 com PBS 0,85% pH 7,2-7,4, e acrescidas de 0,5% (v/v) de formaldeído a 37%. A mistura permaneceu sob agitação por 48 horas a 37°C. Alíquotas da mistura foram coletadas e inoculadas em dois camundongos após 48 horas e posteriormente, em intervalos de 24 horas, até total inativação (Lobato *et al.*, 2010). Os toxóides foram então envasados em frascos âmbar, identificados e armazenados sob refrigeração (2 a 8°C).

Os toxóides tipos C e D foram submetidos a teste de esterilidade para bactérias anaeróbias, bactérias aeróbias e fungos, e a teste de inocuidade, conforme procedimentos

descritos na Instrução Normativa nº 23 (Brasil, 2002). A concentração protéica total foi estimada pelo método de biureto (Nowotny, 1979).

5.2.7.2 Adição de adjuvante

Os toxóides foram emulsionados (Omni-mixer, Sorvall) na proporção 1:1 com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) para a primeira inoculação, e com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) para as demais inoculações (Pires *et al.*, 2012). Uma alíquota foi retirada para realização de teste de inocuidade. As emulsões preparadas foram mantidas sob refrigeração até a inoculação dos animais.

5.2.7.3 Teste de inocuidade

Dois cobaios foram inoculados com volume de 5,0 mL dos toxóides botulínicos tipos C e D a serem examinados, com o dobro da massa da dose teste, por via subcutânea, em dois locais de aplicação diferentes. Os animais foram então observados por um período de sete dias para evidenciar reações locais e/ou sistêmicas significativas (Brasil, 2002).

5.2.7.4 Imunização dos animais

O esquema de imunização foi composto por cinco inoculações, de cada um dos toxóides produzidos, em dois ovinos (Figura 17). As doses foram intervaladas de 21 dias (Bowmer, 1963), tendo as aplicações sido realizadas nos dias 0, 21, 42, 63 e 84. O volume inoculado por animal/dia foi de 2,0 mL, equivalente a uma dose fixa de 200 µg do respectivo antígeno, na região pré-escapular, por via sub-cutânea (Souza *et al.*, 2010; Bowmer, 1963). Antes da administração da dose seguinte, uma amostra de sangue foi coletada para avaliação da resposta imunológica, pelo bioensaio em camundongos.

5.2.7.5 Obtenção do plasma

Após 14 dias da última dose, os animais foram sangrados por punção da veia jugular. Foi utilizada bolsa com anticoagulante citrato de sódio com capacidade para 500 mL. O sangue foi centrifugado a 1200 x g (Evolution RC Sorvall), sob refrigeração a 8°C, por 30 minutos para separar o plasma. O plasma foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores.

5.2.7.6 Preparo das antitoxinas

Um volume inicial do plasma de aproximadamente 90 mL foi medido e preparou-se pelo menos o dobro deste volume de solução de sulfato de amônio a 80%. O plasma foi transferido para um recipiente adequado com barra magnética e em banho de gelo, onde a solução de sulfato de amônio foi gotejada lentamente, sob agitação lenta. A precipitação de IgGs ocorreu em presença do sulfato de amônio, (NH₄)₂SO₄, na concentração de 40%. A mistura foi deixada em banho de gelo por no mínimo duas horas sob agitação, ou *overnight* na geladeira. Após esse período, foi centrifugada a 2500 x g (Evolution RC Sorvall), a 8°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com água destilada/deionizada, para um volume igual ao volume original do plasma. O processo de precipitação com sulfato de amônio foi repetido nas mesmas condições descritas anteriormente, e logo após o gotejamento, foi realizada centrifugação a 2500 x g, a 8°C, por 30 minutos. O

precipitado foi então ressuspendido com o menor volume possível de tampão PBS 0,85% pH 7,2-7,4 (aproximadamente 1/5 do volume original do plasma).



Figura 17 – Ambiente de manutenção dos carneiros utilizados na produção das antitoxinas botulínicas tipos C e D (A) e momento de sangria por punção da veia jugular para obtenção dos anticorpos (B)

Fonte: Arquivo pessoal, 2017

Uma membrana de diálise com 25 ± 2 mm de largura plana, 16 mm de diâmetro, 2,0 mL/cm, tamanho de poro de 12-14.000 Da (VWR Scientific), foi cortada com tamanho compatível à quantidade de solução a ser dialisada, hidratada e montada em um béquer de aproximadamente 3 L. A diálise foi realizada *overnight*, sob refrigeração, em PBS 0,85% pH 7,2-7,4, com pelo menos duas trocas de tampão.

Para verificar o ponto final da diálise, uma alíquota de aproximadamente 2 mL do tampão utilizado foi testada com três a seis gotas de solução de cloreto de bário (BaCl_2) 3,0%. Se houvesse turvação ou formação de um precipitado esbranquiçado, ainda havia resíduo de sulfato de amônio e deveria-se fazer mais uma troca do tampão de diálise, continuando o processo por pelo menos mais 4 horas (LANAGRO, 2015).

Após todo o sulfato de amônio ser eliminado, a solução foi cuidadosamente retirada da membrana, seu volume medido e uma alíquota coletada para a determinação do título por bioensaio em camundongos.

5.2.7.7 Diluição e filtração das antitoxinas

Com o resultado do título, a solução contendo as antitoxinas foi diluída em PBS 0,85% pH 7,2-7,4, de forma que fosse obtido um produto com um título adequado ao uso pretendido (entre 50 e 100 UI/mL). Após diluição, a antitoxina foi filtrada em membrana PVDF com poro de 0,22 μm .

5.2.7.8 Liofilização

A antitoxina diluída e filtrada foi envasada, em alíquotas de 1 mL, em frascos para liofilização de 5 mL. O envase foi feito utilizando micropipeta de alta precisão, calibrada, em cabine de segurança biológica. Rolhas de borracha foram ajustadas na boca do frasco, e em seguida as bandejas com os frascos foram embrulhadas em papel alumínio e transferidas para o

ultrafreezer a -80°C por 48 horas. Após este período, os frascos foram liofilizados em liofilizador de bancada (Christy, Alpha 1-4 LSCplus) (Figura 18).

As antitoxinas produzidas foram mantidas a -80°C . Pelo menos dois frascos do lote de toxina liofilizada, foram separados para realização de testes de controle de qualidade incluindo testes de potência e esterilidade (Brasil, 2002).

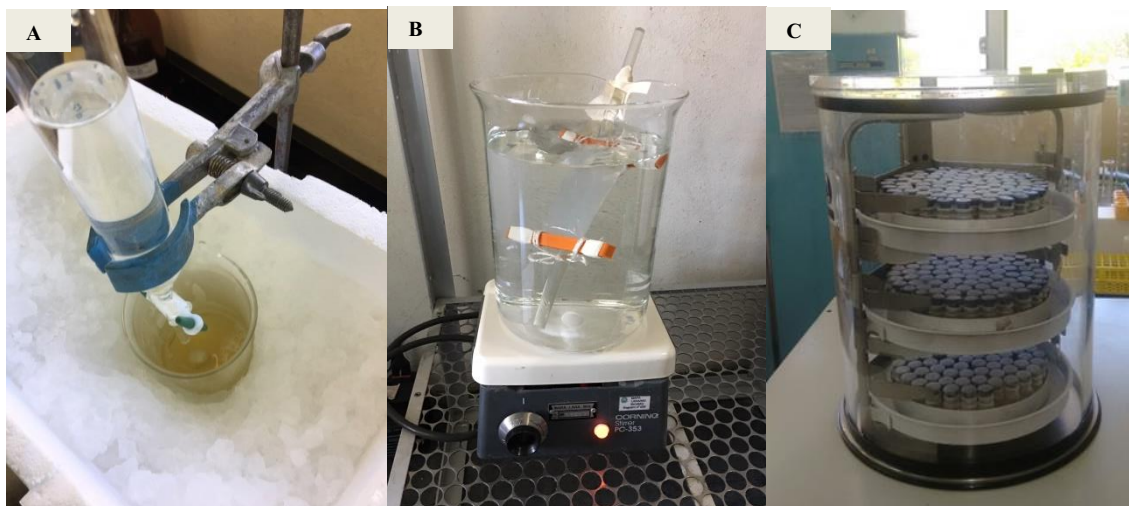


Figura 18 – Etapas da produção das antitoxinas botulínicas tipos C e D: precipitação das imunoglobulinas com sulfato de amônio em banho de gelo (A), diálise (B) e liofilização em liofilizador de bancada (Christy, Alpha 1-4 LSCplus) (C)

Fonte: Arquivo pessoal, 2017

5.2.7.9 Titulação das antitoxinas

A determinação dos títulos das antitoxinas foi realizada por bioensaio em camundongos (Figura 19), descrita pela Instrução Normativa nº 23 do MAPA de 18 de março de 2002 (Brasil, 2002).

As toxinas botulínicas tipos C e D padrão oficiais foram diluídas em solução salina 0,25% peptonada a 1% para conter 1 L+/mL em volume suficiente para a realização dos testes. Já as antitoxinas teste foram diluídas com o mesmo diluente, até obtenção de um conjunto de diluições próximas ao valor esperado do título.

Após a mistura das antitoxinas teste e com a toxina padrão homóloga, em proporções iguais (0,4 mL cada), os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Dois camundongos, pesando entre 18 e 22 g, foram inoculados, por via endovenosa, com 0,2 mL de cada diluição das antitoxinas teste. Para facilitar a inoculação através da veia da cauda, os camundongos foram mantidos em caixa de aquecimento por alguns minutos e seringas descartáveis de 1 mL foram utilizadas. Os camundongos inoculados foram observados por 72 horas, e o título encontrado foi igual à recíproca da menor diluição da antitoxina em que ocorreu morte dos dois camundongos inoculados.



Figura 19 – Etapas do bioensaio em camundongo: preparação das diluições contendo toxina botulínica (tipo C ou D) e antitoxina homóloga (A), manutenção dos camundongos para o teste em caixa de aquecimento (B), inoculação da preparação na veia da cauda do camundongo (C), manutenção dos animais inoculados em caixas dentro de estantes ventiladas com controle de temperatura e pressão (D)

Fonte: Arquivo pessoal, 2017

5.3. Resultados e discussão

5.3.1 Produção das toxinas

A produção das toxinas botulínicas *in vitro* requer a utilização de amostras toxigênicas, bem como meios de cultura específicos, pH, tempo e atmosfera de incubação adequados para o cultivo (Gonçalves *et al.*, 2009).

Após a caracterização e confirmação de pureza e toxigenicidade, a estirpe CBC 02 foi selecionada para a produção da toxina botulínica tipo C, e a estirpe CBD 09 para a produção da toxina botulínica tipo D.

O rendimento obtido nas produções das toxinas é diretamente dependente do meio de cultivo utilizado. No meio contendo água de maceração de milho (*corn steep liquor*), estudado

por Sterne e Wentzel (1950), a toxina botulínica produzida pelo *Clostridium botulinum* tipo C apresentou atividade menor quando comparada com a toxina produzida pela mesma estirpe em meio de cultura descrito por Cardella *et al.* (1958), contendo hidrolisado protéico, extrato de levedura e dextrose. Nesse meio, o título da toxina variou de $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ DL₅₀/mL.

Jorge (2003) testou quatro composições de meios de cultura para produção de toxina botulínica do tipo D e o melhor resultado foi alcançado com o meio composto por 2,0% p/v proteose peptona; 0,5% p/v extrato de levedura; 2,0% p/v glicose; 0,15% p/v MgSO₄ 7H₂O e 0,5% p/v K₂HPO₄. Resultados semelhantes foram obtidos por Moura (2011) e Mozzer (2004) que utilizaram meio de cultura *Peptone Yeast Extract Glucose* (PYG) enriquecido. Nesse trabalho foi empregado o meio nutriente, cuja composição é bem semelhante às anteriormente mencionadas.

Na produção dos lotes das toxinas botulínicas tipos C e D, a fermentação foi conduzida a 37°C, em pH mantido próximo de 7,0 durante todo o processo, e teve duração aproximada de 24 horas. O rendimento em volume do sobrenadante de cultivo ficou próximo do volume inicial de meio utilizado, tendo sido gastos aproximadamente 500 mL de NaOH para ajuste do pH, em cada batelada.

De acordo com Moura (2011), diversas estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D crescem bem entre 37°C e 45°C. O crescimento a 25°C não é favorável e praticamente não há crescimento a 10°C. Gessler e Bohnel (1999) e Gessler *et al.* (2005) cultivaram *Clostridium botulinum* tipos C e D em fermentador a 37°C em pH 6,8.

O crescimento dos *Clostridium botulinum* tipos C e D, durante as produções realizadas neste trabalho, seguiu o padrão esperado, com a expressão máxima de toxinas botulínicas ocorrendo entre o final da fase de crescimento exponencial e o início da fase estacionária. Estas fases têm sua duração intimamente ligadas ao pH do meio, que deve ser mantido em torno de 7,0. Condições mais ácidas ou mais básicas tendem a inibir a transcrição dos genes responsáveis pela produção dessas neurotoxinas (Li *et al.*, 2013). Segundo Jorge (2003), o controle automático de pH proporciona aumento na densidade celular, quando comparado aos cultivos realizados em frascos estáticos e sem controle desta variável.

A entrada na fase estacionária e declínio do crescimento, por sua vez, estão associados à redução de nutrientes essenciais, e à formação de metabólitos. O crescimento celular das bactérias do gênero *Clostridium* é fortemente inibido pelo acúmulo de ácidos orgânicos e etanol no meio fermentado (Mozzer, 2004). Os tipos de ácidos formados dependem da estirpe utilizada, Moura (2011) identificou, ao longo do cultivo de *Clostridium botulinum* tipo D, a formação dos seguintes metabólitos: ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, além do etanol, por cromatografia líquida.

Para contornar o problema de inibição de crescimento, alguns mecanismos podem ser adotados no planejamento da produção como: extração contínua dos produtos tóxicos do fermentador ou controle da oferta de substratos; manipulação genética ou seleção de microorganismos tolerantes; e modificações nos meios de cultivo e em outras condições da fermentação.

5.3.1.1 Purificação das toxinas

Após a etapa de fermentação, os cultivos foram centrifugados sob refrigeração, seguindo estritamente as regras de biossegurança (LANAGRO, 2014b), tendo em vista o risco da manipulação de um volume grande (10 L) de material altamente toxigênico. Procedimentos de purificação previamente descritos para BoNT incluíam pelo menos um passo inicial de centrifugação ou precipitação ácida (Gessler; Bohnel, 1999). Sari (2010) demonstrou que o processo de clarificação com uso de centrifugação refrigerada não comprometeu a atividade das

toxinas botulínicas tipos C e D. Moura (2011) utilizou as técnicas de centrifugação e microfiltração convencional para retirada das células após cultivo de *Clostridium botulinum* tipo D, não tendo observado perda do título da toxina após essas etapas.

O método de purificação e concentração de proteínas utilizado neste trabalho foi a ultrafiltração, que demonstrou ser eficiente em promover o aumento do título das suspensões de toxinas botulínicas tipos C e D. Processos que utilizam tecnologia de membrana como a ultrafiltração, oferecem vantagens na recuperação de bioprodutos, incluindo a facilidade no escalonamento dos equipamentos, elevada estabilidade, condução do processo em temperaturas moderadas, redução do estresse químico e físico, além de permitir que a concentração e a purificação possam ser obtidas em uma única etapa (Zuñiga *et al.*, 2003). De Jongh *et al.* (1989) e Moura (2011) utilizaram ultrafiltração em *hollow-fiber* para concentração de sobrenadante de culturas de BoNT/D, o último registrando um aumento de aproximadamente 3,8 vezes da concentração protéica.

No presente trabalho, o procedimento de produção adotado, gerou um volume final, após as etapas de concentração e filtração, de 200 mL para a toxina botulínica tipo C, e de 400 mL para a toxina botulínica tipo D. Após envase e liofilização, obteve-se 166 frascos (de toxina C) e 260 frascos (de toxina D) contendo, cada um, o resíduo liofilizado de 1mL de solução. Os lotes foram identificados como: Toxina botulínica tipo C Lote 01/2016 e Toxina botulínica tipo D Lote 01/2017.

5.3.1.2 Estimativa de concentração protéica

A concentração protéica foi estimada em 16 mg/mL de proteína total, para a toxina botulínica tipo C e 28 mg/mL de proteína total para a toxina botulínica tipo D.

A Figura 20 apresenta os resultados da eletroforese comparando amostras das toxinas produzidas nesse trabalho (Toxina botulínica tipo C lote 01/2016 e Toxina botulínica tipo D lote 01/2017) com os padrões oficiais do MAPA (Toxina botulínica tipo C lote 01/2011 e Toxina botulínica tipo D lote 03/2007). Percebe-se uma similaridade entre elas, evidenciando principalmente uma banda de alta intensidade próxima a 150 kDa, concordante com o peso molecular da BoNT.

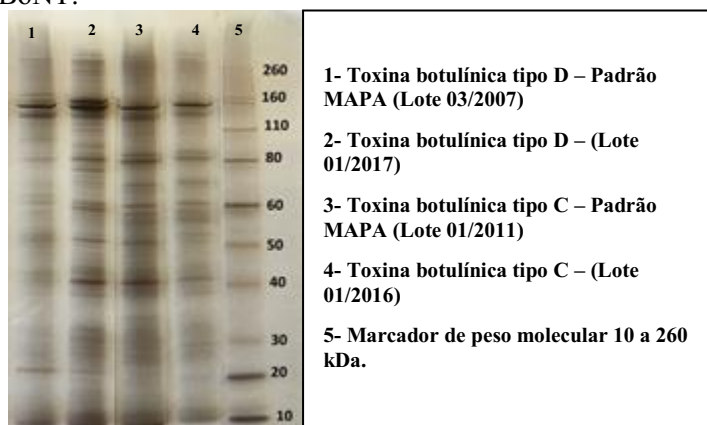


Figura 20 - Eletroforese comparativa da Toxina botulínica tipo C lote 01/2016 e Toxina botulínica tipo D lote 01/2017 com os padrões oficiais do MAPA (Toxina botulínica tipo C lote 01/2011 e Toxina botulínica tipo D lote 03/2007), nas concentrações de 0,16 mg/mL (tipo C) e 0,14 mg/mL (tipo D)

Notas: Utilizado *kit NuPage electrophoresis system* (Thermo Fisher), corrida a 220v e 115 mA por 50 min. e coloração com silver staining

A neurotoxina (BoNT, ~150 kDa) é produzida na forma de um complexo estável devido à associação com proteínas não tóxicas, que podem possuir atividade de hemaglutinina (HA) ou não (NTNH). Os complexos podem ser de três formas: 12S (~ 300 kDa), 16S (~ 500 kDa) e 19S (~ 900 kDa) (Sakaguchi *et al.*, 2015). Para as toxinas tipo C e D foram encontradas as formas 16S (BoNT+HA+NTNH) e 12S (BoNT+NTNH). O componente HA, por sua vez, pode consistir em quatro subcomponentes diferentes, indicados com seus respectivos pesos moleculares entre parêntesis: HA-53 (53 kDa), HA-33 (33 kDa), HA-22-23 (22-23 kDa) e HA-17 (17 kDa) no tipo C (Fujinaga *et al.*, 1994) e tipo D (Ohyama *et al.*, 1995).

As bandas de proteína de massa molar menor que 150 kDa, provavelmente correspondem a esses componentes acessórios às BoNT. Resultados semelhantes foram relatados por autores (Moriish *et al.*, 1989; Gessler; Bohnel, 1999; Sharma *et al.*, 2003; Al-Saleem *et al.*, 2012) que obtiveram perfis de bandas em gel de SDS-PAGE com massas moleculares de 15 a 17 kDa, de 33 a 35 kDa, 50 kDa, 71 a 76 kDa e 130 a 150 kDa, representando as diversas proteínas auxiliares não tóxicas e tóxicas que podem estar associadas com alguns sorotipos de BoNT, formando um complexo altamente resistente à proteólise e a baixos valores de pH.

5.3.1.3 Titulação das toxinas botulínicas tipos C e D produzidas

As toxinas produzidas foram tituladas por bioensaio em camundongos (Brasil, 2002), tendo-se obtidos os seguintes resultados de título: em DMM e em L+:

Toxina botulínica tipo C:

5 x 10⁴ DMM/mL ou 5 x 10³ DMM/0,1 mL

36 L+ em 1 mL que equivale a 360 L+/10 em 1 mL ou 36 L+/10 em 0,1 mL

Toxina botulínica tipo D:

7 x 10⁶ DMM/mL ou 7 x 10⁵ DMM/0,1 mL

800 L+ em 1 mL que equivale a 8000 L+/10 / em 1 mL ou 800 L+/10 em 0,1 mL

A titulação em L+ foi realizada com uso dos padrões de referência de antitoxinas homólogas fornecidos pelo MAPA.

A comparação dos resultados obtidos com dados da literatura não é possível devido aos diferentes métodos de purificação empregados pelos autores, assim como pela diferença entre unidades utilizadas para atribuir o valor do título à toxina (DL₅₀/mg N, DMM/mL, DL₅₀/mL, L+/mL). A Tabela 12 apresenta um resumo de resultados de títulos para toxinas botulínicas tipos C e D encontrados em referências bibliográficas sobre o tema, organizados por etapa de produção.

Diante dos resultados mostrados na Tabela 12 pode-se observar que, em geral, a toxina botulínica tipo D tem como característica, ser mais potente que a toxina tipo C. Isso também foi constatado nesse trabalho.

Outro ponto observado é que alguns processos de purificação mais refinados (como a cromatografia, por exemplo), conseguem melhorar consideravelmente a potência dos produtos obtidos. No entanto, isso vem, em geral, associado a perda de rendimento. Moura (2004) obteve 19,6% de rendimento aplicando cromatografia em coluna XK-50 Q-Sepharose HP para purificação de amostra de cultivo de *Clostridium botulinum* tipo D. Resultado similar foi encontrado por Gessler e Bohnel (1999) que obtiveram rendimento de 12,8% (para toxina C) e 10,6% (para toxina D) após três etapas cromatográficas.

A escolha entre rendimento obtido na produção e grau de purificação do produto final sempre deve considerar o uso final do produto. Como o objetivo nesse trabalho consistia em produzir, em escala laboratorial, muitos frascos de produto (no mínimo 100) a serem submetidos a testes de certificação, priorizou-se o rendimento em detrimento da purificação do produto final. Portanto, não foram introduzidas etapas de purificação mais refinadas no processo. Considerou-se também para a tomada dessa decisão, o fato dos produtos finais serem para uso em métodos diagnósticos ou para a produção de outros materiais (no caso, antitoxinas botulínicas policlonais) e não como medicamento de uso veterinário.

Tabela 12 - Resultados de titulação de toxinas botulínicas tipos C e D, após diferentes etapas de produção e purificação, publicados por diversos pesquisadores

Etapa	Toxina C	Toxina D	Referência
Após cultivo estático	-	4,6 x 10 ⁵ a 6 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	Miyazaki <i>et al.</i> (1977)
	5 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	1 x 10 ⁶ DL ₅₀ /mL	Bower (1963)
	-	1,6 x 10 ⁷ DL ₅₀ /mg N	Cardella <i>et al.</i> (1960)
	1,4 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mg N	-	Cardella <i>et al.</i> (1958)
Após cultivo em fermentador	1,58 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	1,58 x 10 ⁶ DL ₅₀ /mL	Alves (2017)*
	1,58 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	1,58 x 10 ⁵ a 1,58 x 10 ⁶ DL ₅₀ /mL	Sari (2010)
	-	1,58 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	Moura (2004)
	1,0 x 10 ⁴ DL ₅₀ /mL	5,24 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	Jorge (2003)
	4,0 x 10 ⁴ DMM/mL	1,6 x 10 ⁵ DMM/mL	Gessler e Bohnel (1999)
	8,8 x 10 ⁵ DMM/mL	-	Terajima <i>et al.</i> (1985)
Após microfiltração	-	1,58 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL 10 ² L+/mL	Moura (2004)
Após precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	1,9 x 10 ⁷ DMM/mL	-	Terajima <i>et al.</i> (1985)
	-	4 x 10 ¹² DL ₅₀ /mg N	Wenzel <i>et al.</i> (1950)
Após filtração, precipitação com CaCl ₂ e sucessivas extrações com álcool	-	4,76 x 10 ⁸ DL ₅₀ /mg N	Cardella <i>et al.</i> (1960)
	2,2 x 10 ⁷ DL ₅₀ /mg N	-	Cardella <i>et al.</i> (1958)
Após ultrafiltração	1,58 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	1,58 x 10 ⁵ a 1,58 x 10 ⁶ DL ₅₀ /mL	Sari (2010)
	-	6,31 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	Moura (2004)
Após ultrafiltração e diafiltração	-	2,82 x 10 ⁵ DL ₅₀ /mL	Moura (2004)
Após ultrafiltração, diafiltração e precipitação por PEG	1,58 x 10 ⁷ DL ₅₀ /mL	1,58 x 10 ⁸ DL ₅₀ /mL	Alves (2017)*
Após purificação por métodos cromatográficos	-	8,66 x 10 ⁵ a 1,55 x 10 ⁶ DL ₅₀ /mg	Moura (2004)
	8,0 x 10 ⁵ DMM/mL	4,0 x 10 ⁶ DMM/mL	Gessler e Bohnel (1999)
	7,3 x 10 ⁶ DMM/mL	-	Terajima <i>et al.</i> (1985)

* Informação pessoal, Guilherme Guerra Alves, Escola de Veterinária, UFMG, 2017

A) Atendimento a critérios internacionais

Segundo o protocolo Onderstepoort [199?], para serem consideradas satisfatórias como padrões de referência, as toxinas botulínicas tipos C e D devem conter pelo menos 400 DMM em uma dose teste (L+/10). Considerando os resultados de título obtidos, calculou-se essa relação para a toxina botulínica tipo C produzida:

$$(5 \times 10^4 \text{ DMM/mL}) / (36 \text{ L+/mL}) = 1388 \text{ DMM em } 1 \text{ L+} = 139 \text{ DMM em } 1 \text{ L+/10 (dose teste)}$$

Observou-se que a toxina botulínica tipo C ficou com 139 DMM em 1 dose teste (L+/10), portanto, abaixo do desejável, não atendendo ao critério acima mencionado. No entanto, mesmo com esse resultado, optou-se por prosseguir os testes para verificar a potencialidade dessa toxina ser usada como MR.

Já a toxina botulínica tipo D produzida ficou com 875 DMM em 1 dose teste (L+/10), evidenciando a alta toxicidade desse produto, e conseqüentemente a sua potencialidade como MR:

$$(7 \times 10^6 \text{ DMM/mL}) / (800 \text{ L+/mL}) = 8750 \text{ DMM em 1 L+} = 875 \text{ DMM em 1 L+/10 (dose teste)}$$

B) Estabelecimento de rastreabilidade metrológica na titulação da toxina botulínica tipo C

Buscando estabelecer uma rastreabilidade metrológica mais elevada, as toxinas foram testadas frente a padrões de referência de antitoxinas homólogas fornecidas por uma instituição internacionalmente reconhecida, no caso NIBSC, em paralelo aos padrões de referência fornecidos pelo MAPA.

Quando a antitoxina foi diluída em série, e tais proporções foram misturadas a uma diluição fixa da toxina botulínica tipo C (equivalente a 1 L+/10), esperava-se que na diluição contendo 0,1 UI da antitoxina homóloga e nas inferiores, fossem observadas mortes dos camundongos, assim como na preparação sem adição de antitoxinas. Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram que esse comportamento ocorreu quando o padrão de antitoxina C MAPA foi utilizado, e o título da toxina C pode ser determinado como 1 L+, com referência a esse padrão.

No entanto, o mesmo não ocorreu quando se utilizou o padrão de referência NIBSC. O resultado mostrou que a Antitoxina botulínica tipo C NIBSC a 0,05 UI foi capaz de neutralizar 1 L+/10 da toxina testada. Nesse caso, poderia-se concluir que o título da toxina preparada nesse teste seria menor que 0,5 L+, e portanto estaria superestimado. No entanto, algumas informações a cerca da origem dessa antitoxina botulínica tipo C NIBSC, indicaram potenciais problemas de homologia relacionados a esse padrão.

Tabela 13 - Testes de neutralização da toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), produzida a partir da estirpe CBC 02, com padrões de referência de antitoxinas botulínicas tipo C fornecidas pelo MAPA (Lote 01/1995) e pelo NIBSC (01/508), utilizando bioensaio em camundongos

Conc. toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016)	Conc. antitoxina botulínica tipo C	Leitura bioensaio em camundongos		
		Expectativa do resultado	Antitoxina botulínica tipo C MAPA (Lote 01/1995)	Antitoxina botulínica tipo C NIBSC (01/508)
1 L+/10	-	++	++	++
1 L+/10	0,05 UI	++	++	VV
1 L+/10	0,1 UI	++	++	VV
1 L+/10	0,25 UI	VV	VV	VV
1 L+/10	0,5 UI	VV	VV	VV

++ Morte do par de camundongos inoculados

VV Vida do par de camundongos inoculados

A antitoxina botulínica tipo C fornecida atualmente pelo NIBSC (Non WHO Reference Material *botulinum* type C antitoxin, equine NIBSC code: 01/508), apresenta no seu certificado (Versão 7.0, de 24/01/2014) a seguinte informação: “Este material é o resíduo liofilizado do antisoro de cavalo para o complexo de toxina de *Clostridium botulinum* tipo C. Destina-se à calibração do bioensaio para antitoxina botulínica tipo C. O material também pode ser adequado para confirmar a identidade do sorotipo de toxina botulínica/toxóide do tipo C”. Entretanto, observou-se que esse insumo foi produzido a partir de uma estirpe do tipo C/D (C/D 003-9, caracterizada genotipicamente por Nakamura *et al.*, 2013), e não a partir de uma estirpe do tipo C típica. Tal fato pode explicar os resultados discrepantes obtidos durante a realização do teste com a toxina botulínica C produzida nesse trabalho.

O resultado é concordante com o descrito por Moriishi *et al.* (1996a), que observou que

antitoxinas produzidas a partir de estirpes isoladas de larvas e galinhas, posteriormente caracterizadas como mosaicos C/D, eram capazes de neutralizar a neurotoxina tipo C de várias estirpes isoladas nos EUA, assim como a da estirpe “*Seddon*” tipo C isolada de bovinos com botulismo na Austrália.

Outro fato curioso foi quando a antitoxina C NIBSC desafiada com toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017 produzida neste trabalho a partir da estirpe CBD 09), também levou a resultados de neutralização. Conforme apresentado na Tabela 14, 0,1 UI da antitoxina foi capaz de neutralizar 1 DMM da toxina botulínica tipo D e 0,25 UI foram capazes de neutralizar 1 L+/10 da mesma toxina.

Tabela 14 – Testes de neutralização da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) produzida a partir da estirpe CBD 09 com padrão de referência de antitoxina botulínica tipo C NIBSC (01/508), utilizando bioensaio em camundongos

Toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017)	Antitoxina botulínica tipo C NIBSC (01/508)	Leitura do bioensaio em camundongos	
		Expectativa	Resultado
1L+/10	-	++	++
1L+/10	0,25 UI	++	VV
1L+/10	0,5 UI	++	VV
1 DMM	-	++	++
1 DMM	0,1 UI	++	VV
1 DMM	0,5 UI	++	VV

++ Morte do par de camundongos inoculados

VV Vida do par de camundongos inoculados

Nos genes *bont*, a homologia das seqüências de aminoácidos na região N-terminal (H_N) da cadeia pesada é muito alta, porém, aquelas da cadeia leve (LC) e da região C-terminal da cadeia pesada (H_C) são diferentes dependendo das toxinas. Nakamura *et al.* (2012) mostrou que a BoNT/C/D tem uma alta identidade de aminoácidos com a LC da BoNT/C (98%), assim como com a porção H_N (91%), mas compartilha apenas 41% de identidade com a porção H_C da BoNT/C. Já BoNT/D compartilha 93% de identidade com a parte H_C da BoNT/C/D. Como a antitoxina botulínica tipo C do NIBSC é policlonal, tais homologias podem explicar sua capacidade neutralizar tanto a toxina botulínica tipo C quanto a toxina botulínica tipo D.

Finalmente, outro ponto observado na bula da antitoxina botulínica tipo C NIBSC 01/508, é que o valor de potência foi estabelecido como uma potência relativa, determinada pelo método de paralisia flácida local, que é diferente do bioensaio usualmente utilizado no estabelecimento de UI para antitoxinas. Diversos métodos alternativos já foram propostos e devem ser incentivados, porém não há informações suficientes, disponibilizadas pelo produtor do MR, a respeito da equivalência desses métodos e de possíveis incertezas no valor rotulado.

C) Estabelecimento de rastreabilidade metrológica na titulação da toxina botulínica tipo D

Os resultados dos testes realizados para a toxina botulínica tipo D, frente aos padrões de referência de antitoxinas homólogas fornecidas pelo NIBSC e pelo MAPA, estão apresentados na Tabela 15.

Quando a antitoxina foi diluída em série, e tais proporções foram desafiadas com 1 L+/10 da toxina botulínica tipo D, esperava-se que nas diluições da antitoxina homóloga, superiores a 0,1 UI, fosse observada sobrevivência dos camundongos.

Observou-se que quando o padrão de referência utilizado foi do MAPA, os resultados obtidos foram compatíveis com o título esperado das toxinas. Como não houve mortes dos

camundongos na preparação contendo 0,1 UI mas, houve a 0,05 UI, pressupõe-se que o título da toxina esteja entre 1 e 0,5 L+. No entanto, quando foi utilizado o padrão de referência NIBSC, o resultado de morte de camundongos em todas as concentrações de antitoxinas testadas (de 0,025 a 0,5 UI), evidenciou que a antitoxina botulínica tipo D NIBSC não foi capaz de neutralizar a toxina botulínica tipo D lote 01/2017. Uma neutralização só foi observada quando se utilizou uma dose bem baixa de toxina (1 DMM) e esta foi adicionada a 0,5 UI da antitoxina tipo D NIBSC. Novamente, algumas informações a cerca da origem dessa antitoxina indicaram potenciais problemas de homologia relacionados a esse padrão.

Tabela 15 - Testes de neutralização da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), produzida a partir da estirpe CBD 09 com padrões de referência de antitoxinas botulínicas tipo D fornecidas pelo MAPA (Lote 01/2010) e pelo NIBSC (61/001), utilizando bioensaio em camundongos

Conc. toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017)	Conc. antitoxina botulínica tipo D	Leitura do bioensaio em camundongos		
		Expectativa do resultado	Antitoxina botulínica tipo D MAPA (Lote 01/2010)	Antitoxina botulínica tipo D NIBSC (61/001)
1L+/10	-	++	++	++
1L+/10	0,025 UI	++	++	++
1L+/10	0,05 UI	++	++	++
1L+/10	0,1 UI	++	VV	++
1L+/10	0,25 UI	VV	VV	++
1L+/10	0,5 UI	VV	VV	++
1 DMM	-	++	NR	++
1 DMM	0,1 UI	VV	NR	++
1 DMM	0,5 UI	VV	NR	VV

++ Morte do par de camundongos inoculados

VV Vida do par de camundongos inoculados

NR teste não realizado

A antitoxina botulínica padrão internacional tipo D fornecida atualmente pelo NIBSC (*WHO International Standard Botulinum type D antitoxin, 1st International Standard NIBSC code: 61/001*), apresenta no seu certificado (Versão 6.0, de 24/01/2014) a seguinte informação: “Este material é o resíduo liofilizado de antisoro de cavalo para a toxina de *Clostridium botulinum* tipo D. Destina-se à calibração do bioensaio para antitoxina botulínica do tipo D. O material também pode ser usado para confirmar a identidade do sorotipo. Como padrão internacional primário da OMS (61/001 ou BTUSD), destina-se a calibrar padrões internos secundários”. Entretanto, ao utilizar esse padrão para calibrar a toxina botulínica tipo D produzida nesse trabalho não se obteve sucesso, conforme pôde ser observado nos resultados apresentados.

Observando mais atentamente as informações sobre esse material, identificou-se a estirpe D6F como a origem da produção desse material. Essa estirpe foi analisada por técnicas moleculares por Nakamura *et al.* (2013), tendo sido caracterizada como do tipo C. Isso pode explicar a incapacidade de neutralização da antitoxina.

Se for verdadeira a hipótese de que a antitoxina botulínica tipo D do NIBSC seja, de fato, uma antitoxina tipo C, a incapacidade de neutralização da toxina botulínica tipo D é mais facilmente explicada, haja visto que os tipos C e D apresentam homologia pequenas, tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada, em torno de 47 a 37%, respectivamente (Nakamura *et al.*, 2012).

Por outro lado, também existe a possibilidade de que a toxina tenha variações, por exemplo, de aminoácidos em um sítio estratégico da toxina, que possa afetar a ligação e

neutralização por anticorpos (Hill *et al.*, 2007).

O resultado da neutralização de 1 DMM da toxina tipo D (concentração baixa) quando adicionada a 0,5 UI da antitoxina D NIBSC (possivelmente tipo C), pode ser devido a possíveis reações cruzadas entre os tipos C e D nos testes sorológicos, conforme já descrito anteriormente (Moriishi *et al.*, 1989; Oguma *et al.*, 1984; Ochanda *et al.*, 1984; Oguma *et al.*, 1980). Essas reações cruzadas também podem explicar o fato dos produtos do NIBSC terem sido rotulados com sorotipos errôneos, haja visto que na ocasião da produção dessas antitoxinas (Bowner, 1963), não haviam técnicas moleculares e genéticas disponíveis para identificação dos tipos C e D e dos mosaicos C/D e D/C de *Clostridium botulinum* Grupo III.

O NIBSC também distribui um outro padrão de antitoxina botulínica tipo D, de categoria inferior (*Non WHO Reference Material botulinum type D antitoxin, equine, NIBSC code: 01/510*) produzido a partir da estirpe CB-16, a qual também foi caracterizada no trabalho de Nakamura *et al.* (2013), que a classificou como sendo do tipo D. Embora esse material pareça mais promissor como “calibrador” de padrões secundários, que o seu antecessor, ele não estava disponível durante o desenvolvimento desse trabalho, o que impossibilitou a verificação dessa informação.

Reações cruzadas em testes sorológicos já haviam sido evidenciadas desde o estabelecimento das antitoxinas botulínicas C e D NIBSC como padrões de referência internacionais. Bowner (1963) demonstrou naquela ocasião que 1 UI da antitoxina botulínica tipo C era capaz de proteger contra uma dose de 10 DL₅₀ da toxina botulínica D e que a 50 UI da antitoxina botulínica tipo D era capaz de proteger contra uma dose de 1000 DL₅₀ da toxina botulínica D. Porém, ambas foram consideradas satisfatórias, pois não apresentaram neutralização cruzada no nível de teste recomendado em L+.

Tendo em vista as evidências apresentadas, seria altamente recomendável que o NIBSC, enquanto laboratório de referência da OMS revisasse os certificados e bulas desses produtos, declarando de forma explícita a tipificação das estirpes que originaram esses materiais. Os usuários, por sua vez, devem ficar muito atentos aos detalhes técnicos dos certificados de materiais de referência, realizando sempre análises críticas antes do uso, conforme recomendado pelas normas de qualidade (ABNT, 2017b; ISO, 2017).

Por fim, considerando as confirmações obtidas por dados genômicos a respeito das estirpes produtoras de toxinas botulínicas tipo C (CBC 02) e tipo D (CBD 09), típicas e pelas antitoxinas padrão internacional, fornecidas pelo NIBSC, terem origem a partir de estirpe de tipos e subtipos incompatíveis com os rotulados, concluiu-se que estes últimos não seriam apropriados para uso como “calibradores” dos materiais de referência produzidos nesse trabalho. Optou-se então pelo uso dos padrões nacionais do próprio MAPA.

5.3.2 Produção das antitoxinas

Na produção dos toxóides monovalentes, a inativação completa dos antígenos C e D com o uso de formaldeído foi obtida após cinco dias. Os camundongos inoculados permaneceram vivos, indicando que as toxinas botulínicas tipos C e D foram devidamente inativadas, e poderiam ser utilizadas na imunização dos carneiros para produção de soro hiperimune.

O adjuvante de Freund, completo e incompleto, foi escolhido para compor o toxóide devido seu alto poder imunogênico, apesar de poder causar reações adversas locais graves nos mamíferos (Gassmann *et al.*, 1990).

Nos testes de esterilidade, não foi observado crescimento microbiano nos toxóides produzidos, e nos testes de inocuidade, não foram observadas reações de toxicidade residual locais ou sistêmicas. Os ovinos não apresentaram lesões locais significativas devido às

inoculações com adjuvante de Freund, havendo apenas pequenas áreas endurecidas e com pouca ou nenhuma sensibilidade.

O uso do protocolo de imunização apresentado nesse trabalho, com cinco aplicações intervaladas de 21 dias, teve como objetivo obter altos títulos de anticorpos, assim como permitir que ocorresse a maturação de afinidade, gerando anticorpos capazes de se ligar com alta afinidade e avides aos seus antígenos (Danilova; Amemiya, 2009).

A sangria dos animais foi realizada 14 dias após a última inoculação, pois nesse momento o título de anticorpos tende a ser máximo ((Informação Pessoal, Guilherme Guerra Alves, UFMG, 2017). Foram obtidos aproximadamente 450 mL de sangue (para antitoxina C) e 400 mL de sangue (para antitoxina D).

A precipitação e consequente recuperação de proteínas solúveis, mediante a adição de reagentes ou de soluções, constitui técnica simples e rápida para a concentração de proteínas. Nesse trabalho, as purificações dos soros dos ovinos contendo as IgGs contra os antígenos clostridiais foram realizadas com sulfato de amônio, que precipita principalmente IgGs presentes na solução (Page; Thorpe, 2002). Relatos de recuperações de IgG aplicando esse método variam de 85 a 93%, com uma pureza média de cerca de 85% (Gagnon, 2012).

Já a diálise é um método utilizado para separar moléculas através do seu tamanho utilizando uma membrana semipermeável com tamanho do poro definido, de maneira a permitir a passagem seletiva de moléculas. Sua eficiência é dependente de vários fatores (Zuñiga *et al.*, 2003) como: permeabilidade da membrana; natureza do solvente; temperatura; gradiente de concentração, número de trocas do tampão e agitação do solvente.

Nas condições experimentais desse trabalho, as soluções obtidas apresentaram aspecto claro e translúcido, sem grumos, após a precipitação e posterior diálise. O volume final após essa etapa foi de aproximadamente 28 mL (para antitoxina C) e 60 mL (para antitoxina D). Aliquotas foram tituladas por bioensaio em camundongos (Brasil, 2002), tendo sido obtidos títulos de 400 UI/mL (para antitoxina C) e 1400 UI/mL (para antitoxina D).

Guilherme Guerra Alves (informação pessoal, 2017) obteve títulos de 730 UI/mL (para antitoxina C) e 360 UI/mL (para antitoxina D) em ovinos, após aplicação do mesmo protocolo de imunização. Após etapas de purificação que envolveram precipitação pelo ácido caprílico e precipitação com sulfato de amônio, os títulos das antitoxinas botulínicas C e D foram reduzidos de 730 para 280 UI/mL e de 360 para 280 UI/mL, respectivamente. Reduções de títulos durante processos de purificação são esperadas, uma vez que as imunoglobulinas são submetidas aos estresses químico, pelos reagentes utilizados, e físicos, como congelamento, descongelamento, agitação, centrifugação e filtração. Nesse mesmo trabalho, foram determinados os índices de avides das imunoglobulinas G purificadas, tendo sido obtido 70,70% para anti-botulínica C e 68,67% para anti-botulínica D.

Assim como na produção das toxinas botulínicas, no presente trabalho também foi priorizado o rendimento em detrimento da pureza para a produção das antitoxinas botulínicas, não tendo sido aplicada a metodologia descrita anteriormente como etapa adicional à purificação. O procedimento adotado gerou amostras com bom rendimento e baixo custo, além da rapidez e facilidade de aplicação. Os altos títulos obtidos evidenciam a qualidade dos toxóides utilizados e a eficiência do esquema de imunização utilizado.

As titulações das antitoxinas brutas são imprescindíveis para definir a diluição a ser feita, a fim de alcançar um material de referência com um título apropriado ao uso pretendido. As antitoxinas brutas foram diluídas para que os produtos contivessem no mínimo 50 UI/mL após reconstituição do liofilizado.

O rendimento final, em volume, após a filtração foi de 104 mL (para antitoxina C) e 136 mL (para antitoxina D). Após envase e liofilização, foram obtidos 104 frascos (de antitoxina C) e 112 frascos (de antitoxina D) contendo, cada um, o resíduo liofilizado de 1mL de solução. Os

lotes foram identificados como: Antitoxina botulínica tipo C Lote 01/2017 e Antitoxina botulínica tipo D Lote 01/2017. O título foi confirmado por bioensaio em camundongos, tendo sido obtido 65 UI para antitoxina botulínica tipo C e 55 UI para antitoxina botulínica tipo D.

5.4 Conclusão

Lotes de toxinas botulínicas e antitoxinas botulínicas tipos C e D foram produzidos utilizando métodos de baixa complexidade e sem etapas de purificação refinadas.

Os produtos foram aprovados nos testes de controle de qualidade que incluíram esterilidade, quantificação e perfil protéico, e titulação por bioensaio em camundongos. A toxina botulínica tipo C foi o único produto que apresentou um título abaixo do desejável.

As toxinas botulínicas foram testadas frente a padrões de referência de antitoxinas homólogas do MAPA e do NIBSC, tendo sido constatado que esses últimos não apresentaram resultados coerentes ao tipo de toxina testado.

As toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D produzidas foram encaminhadas para testes de certificação como MRCs, descritos no próximo capítulo.

6. CAPÍTULO 3: CERTIFICAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA: ESTIRPES *Clostridium botulinum*, TOXINAS E ANTITOXINAS BOTULÍNICAS TIPOS C e D

6.1. Introdução

O desenvolvimento de MRs para análises microbiológicas e de biologia molecular é bastante desafiador devido às dificuldades encontradas na sua estabilização e recuperação; precisão na distribuição do material entre as unidades; interações com outros componentes da matriz; presença de ácidos nucleicos, proteínas ou outros alvos moleculares adequadamente construídos para identificar organismos selecionados ou suas partes.

A produção de MRs de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, e de suas respectivas toxinas e antitoxinas, é de grande importância. Esses materiais são requeridos por indústrias farmacêuticas na produção e controle de vacinas veterinárias anti-botulínicas, por laboratórios e centros de pesquisa, no desenvolvimento e validação de métodos, na execução de ensaios para identificação desses micro-organismos ou de suas toxinas, e por fim, pelo órgão regulador, para controles fiscais e produção de MRs.

Os objetivos específicos do trabalho descrito neste capítulo, consistiram em produzir e certificar estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, e certificar toxina botulínica tipo D e antitoxinas botulínicas tipos C e D (produções já descritas no Capítulo anterior), como MRCs. A certificação foi realizada em conformidade com a ABNT ISO GUIA 35 (2012) e ISO GUIDE 35 (2017), e consistiu na realização de ensaios de homogeneidade, estabilidade e caracterização dos candidatos a MRC.

6.2. Material e métodos

6.2.1 Local de realização do experimento

Os experimentos relacionados à caracterização fenotípica e genotípica das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D candidatas a MRC foram descritos no Capítulo 1.

Os demais experimentos de certificação dos materiais foram realizados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG.

6.2.2 Certificação de materiais de referência de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

6.2.2.1 Seleção das estirpes de *Clostridium botulinum* candidatas a MRCs

A seleção das estirpes, candidatas a MRCs, foi realizada com base nos resultados de crescimento em meios específicos, pureza e confirmação da sua identidade (gênero, espécie e tipo), conforme já descrito no Capítulo 1. Foi também assegurada a capacidade de produção de toxina, conforme descrito no Capítulo 2.

6.2.2.2 Produção de MRC de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Para o preparo do lote de MRC de *Clostridium botulinum* tipos C e D, a estirpe selecionada foi cultivada em meio RCM, com incubação a 37°C, em anaerobiose, por aproximadamente 24 horas. Após crescimento, um inóculo de 2 mL foi feito em 9 tubos

contendo aproximadamente 20 mL de meio RCM. Esses tubos foram submetidos às mesmas condições de incubação descritas anteriormente. O conteúdo dos tubos foi reunido e a suspensão de células foi centrifugada a 12.000 xg por 1 hora, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 20 mL de solução de leite em pó desnatado 10% estéril.

A suspensão bacteriana foi envasada, em alíquotas de 1 mL, em frascos para liofilização de 5 mL. O envase foi feito utilizando micropipeta de alta precisão, calibrada, em cabine de segurança biológica. Rolhas de borracha foram ajustadas na boca do frasco, e em seguida as bandejas com os frascos foram embrulhadas em papel alumínio e transferidas para o *ultrafreezer* a -80°C por 48 horas. Após este período, os frascos foram liofilizados em liofilizador de bancada (Christ, Alpha 1-4 LSCplus), por 24 horas e mantidos a -20°C.

6.2.2.3 Estudo de homogeneidade: MRC de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

A homogeneidade foi verificada pela manutenção da viabilidade das células, constatada por resultados de crescimento da estirpe em meios específicos (*Reinforced Clostridial Medium* - RCM (Difco), ágar sangue de carneiro a 5% (AS) e ágar gema de ovo, em pelo menos 10% do total de frascos produzidos).

Os testes de pureza e de capacidade de crescimento em anaerobiose foram descritos no item 4.2.3. Em suma, nos meios sólidos, unidades formadoras de colônias foram avaliadas por morfologia de colônia, aspecto da hemólise (em ágar sangue), presença de lipase (em ágar gema de ovo), método de Gram e visualização dos esporos no corpo celular. No meio líquido de cultivo, observou-se a formação de massa celular, ora em suspensão ou como precipitado, além de espuma e formação de gases.

6.2.2.4 Estudo de estabilidade: MRC de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

A estabilidade foi verificada em, pelo menos, sete momentos distintos, no período compreendido entre junho de 2016 e novembro de 2018, por meio dos seguintes testes: avaliação da pureza e crescimento da estirpe em meios específicos em anaerobiose (conforme adotado para o estudo de homogeneidade), presença de genes *bont* por PCR duplex convencional e PCR em tempo real, e verificação da capacidade de produção de toxina, com avaliação por bioensaio em camundongos.

A descrição completa das metodologias para as PCRs utilizadas nesse estudo está apresentada no item 4.2.4. Resumidamente, na PCR duplex convencional (adaptada de Prévot *et al.*, 2007) foi testada a presença de genes *bont/C* e *bont/D*. Já na PCR em tempo real (Woudstra *et al.*, 2012), oligonucleotídeos que identificam tanto as partes N-terminais como C-terminais dos genes *bont/C* e *bont/D* permitiram uma tipificação mais precisa, confirmando a identidade das estirpes com diferenciação entre tipos mosaicos (C/D ou D/C) e não mosaicos (C e D).

Para verificação da capacidade de produção de toxina, a estirpe selecionada foi cultivada em meio RCM, com incubação a 37°C, em anaerobiose, por aproximadamente 24 horas. Após crescimento, a suspensão de células foi centrifugada a 4500 xg por 1 hora (Evolution RC Sorvall). O sobrenadante foi transferido para um frasco, filtrado em 0,22 µm e testado nas diluições 1:10 e 1:100 por bioensaio em camundongos, conforme método para determinação de título em DMM (Solomon; Lilly, 2001).

6.2.2.5 Caracterização: MRC de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Na caracterização do MR foi utilizada a abordagem de um único procedimento de medição de referência em um único laboratório, conforme previsto na ABNT ISO 17034

(2017b) e ISO Guide 35 (2017). O método de escolha foi o sequenciamento genômico e a identificação do *locus* da BoNT e elementos genéticos móveis.

A metodologia de sequenciamento genômico e das análises de bioinformática estão apresentadas no item 4.2.5.

6.2.3 Certificação de materiais de referência de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

6.2.3.1 Estudos de homogeneidade: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

A avaliação da homogeneidade foi realizada após o material ter sido envasado na sua forma final. O plano de amostragem utilizado na escolha dos frascos para o estudo de homogeneidade foi aleatório estratificado. De cada lote produzido, de toxinas e antitoxinas, foram selecionados 10 frascos, divididos em cinco grupos de dois frascos, contemplando desde o início até o fim do processo de envase, selecionados de maneira aleatória por sorteio.

O método de análise adotado para o estudo de homogeneidade foi o bioensaio em camundongos com determinação do título, no caso das toxinas em L+, e no caso das antitoxinas em UI.

Um dos frascos do grupo de 10, selecionado aleatoriamente por sorteio, foi analisado em quintuplicata. O conteúdo do frasco selecionado foi reconstituído, homogeneizado, diluído e cinco alíquotas foram extraídas, e a partir destas realizado o conjunto de diluições proposto. Complementarmente, nove frascos selecionados foram reconstituídos separadamente, e uma alíquota de cada um foi extraída a fim de ser utilizada no preparo do conjunto de diluições proposto. Os valores de propriedade em L+ ou UI foram determinados.

6.2.3.2 Estudos de estabilidade: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

Demonstrada a homogeneidade dos produtos, foram realizados estudos de estabilidade a curto e a longo prazos, adotando-se o leiaute clássico, onde as amostras foram avaliadas à medida que o tempo transcorreu.

O estudo a curto prazo foi realizado a temperatura ambiente (25°C) durante quatro semanas, tomando-se preferencialmente, dois frascos por semana. Para o estudo a longo prazo, as amostras foram acompanhadas durante aproximadamente um ano, em três condições térmicas: refrigerado (5°C), congelado (-20°C) e supercongelado (-80°C). Foram analisados, preferencialmente, dois frascos a cada dois meses, de cada temperatura avaliada. A temperatura adotada como referência foi -80°C.

As amostras foram avaliadas quanto à manutenção do título (em L+ para as toxinas e em UI para antitoxinas) por bioensaio em camundongos (Brasil, 2002).

6.2.3.3 Estudos de caracterização: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

A caracterização foi realizada por meio de estudo colaborativo entre sete instituições brasileiras, incluindo indústrias produtoras de vacinas contra botulismo e laboratórios que realizam testes de vacina e/ou diagnóstico de botulismo animal.

A escolha dos participantes levou em conta duas premissas:

- a) que os laboratórios selecionados eram capazes de determinar os valores dos materiais, fornecendo resultados com precisão aceitáveis;
- b) que as diferenças entre os resultados individuais eram variações por natureza, independentemente de fatores externos, tais como: pessoal, equipamentos, etc.

Os materiais foram distribuídos aos participantes, devidamente acondicionados para evitar contaminações, riscos ao meio ambiente ou à saúde pública, em embalagens modelo GU07, em atendimento às exigências de transporte para produto biológico UN3462, contendo gelo seco. No recebimento, os participantes foram orientados a inspecionar as toxinas e antitoxinas e registrar as condições de recebimento das amostras. Também foram orientados a armazenar os materiais em freezer em temperatura igual ou inferior a -20°C até o momento da realização dos testes.

A propriedade escolhida para certificação de toxina botulínica candidata a MRC foi o título expresso em L+, e para as antitoxinas botulínicas, o título expresso em UI. O método utilizado foi o bioensaio em camundongos, método considerado “padrão ouro” para a determinação do título destes insumos (Brasil, 2002).

Três produtos foram avaliados, sendo estes: Toxina botulínica tipo D (Lote 01/17), Antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/17) e Antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/17), visando sua certificação como materiais de referência, conforme requisitos estabelecidos pelas ISO Série 30. Os laboratórios selecionados receberam também um frasco do respectivo padrão de referência do MAPA: Antitoxina botulínica tipo D (Lote 02/2017); Toxina botulínica tipo C (Lote 01/2011) e Toxina botulínica tipo D (Lote 02/2007).

Cada laboratório participante recebeu uma identificação unívoca, constituída por códigos alfanuméricos, de conhecimento apenas da organização coordenadora. Foram orientados a realizar a determinação do título dos produtos, em triplicata, reportando os resultados de cada replicata, e registrando todos os insumos e equipamentos críticos utilizados, com suas respectivas informações de rastreabilidade (por ex. lote das soluções, validade da calibração de micropipetas, dentre outros).

6.2.3.4 Análises estatísticas: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

A escolha do procedimento de medição a ser utilizado nos estudos de homogeneidade deve ter uma boa precisão. O desvio padrão das medições deve ser pequeno em comparação com a incerteza esperada para o valor de cada propriedade medida. Idealmente, o desvio padrão de repetibilidade para o procedimento de estudo de homogeneidade deve ser inferior a um terço da incerteza padrão alvo, conforme Equação 2, onde n_{al} é o número de observações em cada uma das n alíquotas tomadas de cada unidade para medição (ISO, 2017).

$$\frac{s_r}{\sqrt{n_{al}}} \leq \frac{\mu_{trg}}{3} \quad (2)$$

A homogeneidade foi avaliada pela modelagem de uma regressão relacionando a variável dependente *título* em função da variável independente *frascos de amostras*.

Para verificar a significância da inclinação da reta ajustada, recorreu-se ao teste de hipótese para comparação do β_1 em relação ao valor de referência, onde β_1 é o valor estimado da inclinação e zero é a própria referência. A hipótese nula é de que β_1 é igual a zero (referência), e a hipótese alternativa assume dois eventos unilaterais: 1) a inclinação é maior que zero se a tendência é positiva; 2) a inclinação é menor que zero se a tendência é negativa. Estabelece-se então a regra do teste unilateral para 95% de confiança. Sejam as hipóteses em questão:

$$\begin{cases} H_0: \beta_1 = 0 \\ H_1: \beta_1 > 0, \text{ se } b_1 \text{ for positivo} \\ H_1: \beta_1 < 0, \text{ se } b_1 \text{ for negativo} \end{cases}$$

Calcula-se a estatística discriminante L :

$$L = \begin{cases} \beta_1 - t_{(0,05;n-2)} * u_{b_1}, & \text{se } b_1 > 0 \\ \beta_1 + t_{(0,05;n-2)} * u_{b_1}, & \text{se } b_1 < 0 \end{cases}$$

Onde $t_{(0,05;n-2)}$ é o valor tabelado da distribuição *t-student* cujo valor de significância unilateral é 0,05, $n-2$ é o número de graus de liberdade para cada curva, e u_{b_1} é a incerteza-padrão da inclinação obtida pelo MMQO (Método dos Mínimos Quadrados Ordinário). A tomada de decisão de homogeneidade do material é orientada de acordo com o Quadro 5 abaixo.

Quadro 5 – Matriz para tomada de decisão a respeito da uniformidade do material, considerando o sinal (positivo ou negativo) dos valores da inclinação (β_l) da curva obtida com os resultados do estudo de homogeneidade, e do limite discriminante calculado

Inclinação (β_l)	Limite discriminante (L)	
	Positivo	Negativo
Positiva	Heterogêneo	Homogêneo
Negativa	Homogêneo	Heterogêneo

Conforme o Quadro 5, o material é considerado homogêneo se a inclinação da reta passar pela hipótese H_0 , ou seja, se β_l puder assumir valor zero no intervalo de confiança de β_l . Isto significa que, nessas condições, não é possível rejeitar a hipótese de nulidade da inclinação, e, portanto, da igualdade de resultado entre os frascos.

Nos casos onde a inclinação for significativa, o produtor de MRC pode realizar uma checagem para homogeneidade suficiente (ISO, 2017). Uma estimativa da variação inter-frascos, s_{bb} , pode ser comparada com um desvio-padrão alvo para homogeneidade previamente estabelecido para decisão de tolerância (Van der Veen *et al.*, 2001a). O cálculo de s_{bb} , pode ser realizado pela Equação 3:

$$s_{bb}^2 = u_c^2 - s_r^2 \quad (3)$$

Onde

u_c^2 : variância inter-frascos;

s_r^2 : variância das replicatas do mesmo frasco.

Na prática, s_r é obtida analisando-se um frasco várias vezes e μ_c é obtida analisando-se várias unidades de frasco, obtendo um resultado de cada. Para a estimativa da variabilidade entre frascos, por esta abordagem, é vital que os resultados sejam obtidos pela mesma técnica analítica e usando a mesma quantidade de amostra.

A estabilidade foi estudada pelas mesmas ferramentas estatísticas usadas no estudo de homogeneidade. A diferença é que em vez de a amostragem ocorrer no mesmo instante para todos os frascos, ela ocorreu em períodos e condições de temperatura pré-determinadas. O mesmo método de inferência pode ser desenvolvido para chegar ao Quadro 6, onde a palavra “Homogêneo”, foi trocada por “Estável”, e a palavra “Heterogêneo”, por “Instável”.

Quadro 6 – Matriz para tomada de decisão a respeito da estabilidade ou instabilidade do material, considerando o sinal (positivo ou negativo) dos valores da inclinação (b_l) da curva obtida com os resultados do estudo de estabilidade, e do limite discriminante calculado

Inclinação (β_l)	Limite discriminante (L)	
	Positivo	Negativo
Positiva	Instável	Estável
Negativa	Estável	Instável

O valor médio do valor de propriedade do MRC (título) e a incerteza da caracterização foram calculados a partir dos dados obtidos no estudo colaborativo.

A Equação do mensurando “título” (Equação 4) foi representada pela soma do valor obtido na caracterização com as correções de homogeneidade, estabilidade a curto prazo, e estabilidade a longo prazo.

$$c_{MRC} = c_{car} + \delta c_{bb} + \delta c_{lts} + \delta c_{sts} \quad (4)$$

O título do MRC foi determinado pela média das médias dos valores individuais obtidos no estudo colaborativo pela Equação 5:

$$\bar{Y} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p Y_i \quad (5)$$

As correções de homogeneidade, estabilidade a curto e a longo prazos têm média nula, porque seus respectivos estudos não têm o condão de alterar o resultado médio.

Já a incerteza padrão combinada associada ao valor de propriedade (título) do MRC pode ser expressa pela Equação 6. As incertezas de homogeneidade, estabilidade a curto (5°C) e a longo prazo (-20°C ou -80°C) foram obtidas experimentalmente neste trabalho, e atribuiu-se a elas estimativas do tipo A de distribuições *t-student*.

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{car}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad (6)$$

A incerteza-padrão da caracterização foi dada pela Equação 7:

$$\mu_{car} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (7)$$

Onde:

p indica o número de laboratórios participantes;

s desvio-padrão amostral (s) é calculado pela Equação 8:

$$s^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (8)$$

A estimativa da incerteza da homogeneidade foi baseada na perspectiva do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (JCGM, 2008) quando os valores são obtidos por método alternativo não utilizando ANOVA. A variação das médias dos frascos (μ_{bb}) é uma incerteza combinada da heterogeneidade entre-frascos (s_{bb}) e da variação (desvio padrão) da medição (s_r). Portanto, a incerteza-padrão da homogeneidade foi calculada pela Equação 9, considerando os dados obtidos no estudo de homogeneidade inter-frascos:

$$\mu_{bb} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (9)$$

A incerteza padrão da estabilidade a curto prazo foi calculada pela Equação 10 considerando a incerteza associada a inclinação (s_b) após a análise de regressão, dos resultados obtidos na temperatura recomendada para transporte (ou seja, 5°C) e multiplicando pelo tempo máximo estimado para transporte (t), que foi estabelecido em 30 dias,:

$$\mu_{sts} = s_b \times t \quad (10)$$

Da mesma forma, a incerteza padrão da estabilidade a longo prazo foi calculada pela Equação 11 considerando a incerteza associada a inclinação (s_b) após a análise de regressão, dos resultados obtidos na temperatura recomendada para armazenamento (ou seja, -80°C para antitoxina C e -20°C para os demais) e multiplicando pelo tempo de prateleira estimado (t), que foi estabelecido em 365 dias (1 ano).

$$\mu_{lts} = s_b \times t \quad (11)$$

A Equação 6 parte do pressuposto de que as variáveis da Equação 4 são estatisticamente independentes. Deste ponto, instiga-se a reflexão sobre como variâncias de variáveis tão semelhantes entre si podem ser diretamente somadas como se fossem variáveis independentes na Lei de Propagação de Incertezas. Na obtenção dos dados, o que as diferencia são três condições experimentais básicas: repetibilidade/reprodutibilidade, tempo e temperatura. Isso leva a crer que a expressão sem os termos de covariância poderia omitir a verdadeira redundância dessa combinação, e, por conseguinte, subestimaria a incerteza do título. A expressão da correlação amostral entre as duas primeiras grandezas de entrada está representada na Equação 12:

$$\text{cor}(L_{car}, C_{hom}) = \frac{\sum_{i=1}^n (L_{car_i} - \bar{L}_{car})(C_{hom_i} - \bar{C}_{hom})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (L_{car_i} - \bar{L}_{car})^2 \sum_{i=1}^n (C_{hom_i} - \bar{C}_{hom})^2}} \quad (12)$$

Na prática, essa correlação é inviável de se estimar porque dependeria de um conjunto de dados experimentais para a correção de homogeneidade. E dependeria de um conjunto para cada correção, se fossem considerados todos os pares de correlação. No caso de caracterização realizada por estudo colaborativo, seria necessário que cada participante, além de enviar seus resultados, enviasse também os valores de correções utilizados para o mesmo modelo de medição, formando assim o conjunto de dados das grandezas de entrada e a viabilidade de se estimar as correlações.

Mesmo as considerações apresentadas, neste trabalho foi desenvolvida uma estimativa de medição com incerteza sob hipótese de independência, e outra estimativa sob hipótese de correlações iguais a 0,5 entre as grandezas de entrada, para fins de comparação.

6.2.3.5 Análise estatística para previsão de validade do MR

Os limites superior (L_{upr}) e inferior (L_{lwr}) de uma faixa aceitável de valores de um MR, quando a degradação segue uma forma linear simples, podem ser calculados pelas Equações 13 e 14, onde x é o tempo a partir do início do teste de estabilidade.

$$L_{upr} - \left[b_0 + b_1 t_{s,upr} \pm t_{95,n-2} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(t_{s,upr} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \right] = 0 \quad (13)$$

$$L_{lwr} - \left[b_0 + b_1 t_{s,lwr} \pm t_{95,n-2} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(t_{s,lwr} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \right] = 0 \quad (14)$$

O tempo de prateleira (t_{shelf}) é escolhido de acordo com a Equação 15:

$$t_{shelf} = \min(t_{s,upr}, t_{s,lwr}) \quad (15)$$

6.3. Resultados e discussão

6.3.1 Certificação de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

6.3.1.1 Seleção das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D candidatas a MRCs

As estirpes CBC 02 de *Clostridium botulinum* tipo C e a CBD 09 de *Clostridium botulinum* tipo D foram escolhidas como candidatas a materiais de referência certificados.

A escolha foi baseada nos resultados satisfatórios de crescimento e pureza obtidos com essas estirpes, e nas confirmações fenotípicas e genotípicas relativas ao gênero, espécie e tipos, conforme descrito no Capítulo 1. Foi ainda de suma importância para a escolha, a capacidade dessas estirpes produzirem suas respectivas BoNTs, conforme apresentado no Capítulo 2, indicando estabilidade do fago e nível de expressão detectável.

Além dos aspectos técnicos, a escolha considerou também o fato destas estirpes já pertencerem ao banco de referência do LFDA-MG, não levando a desdobramentos relativos a direitos de propriedade, visto que a própria instituição é o produtor do MRC.

Adicionalmente, a caracterização das estirpes foi imprescindível para validá-las também como uma origem rastreável na produção dos MRCs de toxinas botulínicas dos tipos C e D.

6.3.1.2 Produção e certificação das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

Foi produzido um lote de 30 frascos contendo a estirpe CBD 09 de *Clostridium botulinum* tipo D, em junho de 2016. Um lote de 43 frascos, produzido pelo LFDA-MG em maio de 2011, contendo a estirpe CBC 02 de *Clostridium botulinum* tipo C também foi utilizado na avaliação como candidato a MRC.

Para o teste de homogeneidade, 03 frascos da estirpe CBD 09 foram avaliados em relação à pureza e crescimento em meios específicos, tendo obtido resultados satisfatórios. Para a estirpe CBC 02 foram testados 04 frascos. Considerando que para todos os frascos testados foram obtidos resultados satisfatórios de crescimento, o produto foi considerado homogêneo.

Para avaliar a estabilidade, frascos das estirpes armazenadas a -80°C , no período de 2011 a 2018 (para CBC 02) e no período de 2016 a 2018 (para CBD 09), foram submetidos a testes qualitativos de: pureza, crescimento bacteriano em meios específicos, PCR convencional e em tempo real, e bioensaio em camundongos para avaliar capacidade de produzir toxina. Houve 100% de concordância entre os resultados obtidos e os resultados esperados (Tabelas 16 e 17).

Para a estirpe CBC 02, produzida em 2011, ficou demonstrada sua estabilidade por pelo menos sete anos, e para a estirpe CBD 09, produzida em 2016, por pelo menos dois anos, armazenadas a -80°C .

Tendo em vista o adequado armazenamento desse material (-80°C) e o resultado alcançado com a estirpe CBC 02, espera-se que um período de validade de pelo menos 10 anos, seja razoável para ser estabelecido para MRC de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D.

Tabela 16 – Resultados dos testes de pureza, crescimento, PCR duplex convencional, PCR em tempo real e capacidade de produção de toxina realizados para a estirpe CBD 09 no período de avaliação do estudo de estabilidade, e a relação entre os resultados satisfatórios obtidos e o total de testes realizados

Mês/ano	Pureza e crescimento em meios específicos ¹	PCR duplex convencional ²	PCR em tempo real ³	Produção de toxina ⁴
07/2016	+++	+	NR	NR
08/2016	+	NR	NR	NR
10/2016	++	NR	NR	NR
12/2016	+	NR	+	+
01/2017	+++	+	NR	+
02/2018	++	+	NR	NR
03/2018	NR	+	NR	NR
11/2018	+	NR	+	+
Resultados satisfatórios/total de testes realizados	13/13	04/04	02/02	03/03

¹ Ágar sangue, ágar gema de ovo e/ou *Reinforced Clostridium Medium* (RCM)

² Adaptado de Prévot *et al.*, 2007

³ Woudstra *et al.*, 2012

⁴ Bioensaio em camundongos segundo Solomon; Lilly, 2001

+: Positivo para crescimento, identificação na PCR ou produção de toxina. Cada + significa um resultado satisfatório

NR: teste não realizado

Tabela 17 – Resultados dos testes de pureza, crescimento, PCR duplex convencional, PCR em tempo real e capacidade de produção de toxina realizados para a estirpe CBC 02 no período de avaliação do estudo de estabilidade, e a relação entre os resultados satisfatórios obtidos e o total de testes realizados

Mês/ano	Pureza e crescimento em meios específicos ¹	PCR duplex convencional ²	PCR em tempo real ³	Produção de toxina ⁴
06/2016	++	NR	NR	+
07/2016	++++	+	NR	+
08/2016	+	NR	NR	NR
12/2016	NR	NR	+	NR
01/2018	++	+	NR	NR
02/2018	+	+	NR	NR
10 e 11/2018	+	NR	+	+
Resultados satisfatórios/total de testes realizados	11/11	03/03	02/02	03/03

¹ Ágar sangue, ágar gema de ovo e/ou *Reinforced Clostridium Medium* (RCM)

² Adaptado de Prévot *et al.*, 2007

³ Woudstra *et al.*, 2012

⁴ Bioensaio em camundongos segundo Solomon; Lilly, 2001

+: Positivo para crescimento, identificação na PCR ou produção de toxina. Cada + significa um resultado satisfatório

NR: teste não realizado

6.3.2 Certificação das toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

Nessa etapa do trabalho, foram avaliadas as características de homogeneidade e estabilidade dos lotes de toxinas botulínicas C e D e de suas respectivas antitoxinas (produção descrita no Capítulo 2), a partir dos resultados gerados pelo conjunto experimental, utilizando a grandeza título (L+ para toxinas e UI para antitoxinas) como mensurando. E, finalmente

apresentar os dados da caracterização desses produtos realizada por meio de um estudo colaborativo e concluir sobre a classificação como MRCs.

6.3.2.1 Mensurando

A definição do mensurando dentro de um experimento é sempre limitada no conhecimento acerca das grandezas envolvidas no processo. No caso deste estudo, o título foi obtido por uma sequência de medições cujo espaço amostral é definido pelo próprio planejamento experimental. Diferentemente da transformação de um sinal analítico numa medida do mensurando, como em quase todas as medições, neste contexto, é preciso definir uma escala de possíveis resultados (diluições da toxina ou antitoxina) para testá-los observando uma evidência, a morte dos camundongos. Quando nenhum resultado da escala planejada coincide com a definição do mensurando, um novo planejamento é desenhado e executado utilizando outra escala ou espaço amostral, prosseguindo na marcha analítica investigativa até que um resultado seja obtido.

O conceito de preparar diluições e testá-las para saber qual apresenta o sinal correspondente ao do mensurando seria análogo ao fato de o analista ter que construir seu próprio instrumento para fazer a medição. Esse instrumento teria uma escala e resolução muito limitadas pelos poucos recursos disponíveis na construção do mesmo. Isso é exatamente o que acontece quando o analista prepara seu sistema de medição com uma série de diluições.

Nesse teste, são consumidas as toxinas e antitoxinas, e os camundongos, os quais são eutanasiados, mesmo que sobrevivam ao experimento. Tal reflexão aborda tanto uma restrição metrológica, tendo em vista os aspectos críticos do sistema de medição, quanto uma restrição de viabilidade, que se divide em duas causas: financeira e da bioética.

Aceitar a hipótese da construção do próprio instrumento induz a conclusão de que o modelo de medição do título é similar ao de uma medição direta com indicação digital. Portanto, o valor do mensurando corresponderá, a um valor de diluição preparado, e não é possível saber se uma diluição intermediária (não preparada) evidenciaria a morte dos camundongos. Note que o termo “digital” se refere ao completo desconhecimento do comportamento do sinal entre os valores discretos do espaço amostral.

Seja o modelo de medição definido com uma única grandeza de entrada, do tipo “ $Y = X$ ”, onde X é o maior valor de diluição da toxina que mata o par de camundongos. Se houver pelo menos um valor que mata o par, e pelo menos um valor que não mata o par, no mesmo conjunto de preparação (escala), o experimento é válido e um valor de mensurando é obtido. Caso contrário, ou seja, todas as diluições matando o par ou todas não matando, o experimento é inválido e nenhum valor de mensurando é obtido. Assim, deve ser preparada uma nova escala, menos letal ou mais letal, respectivamente.

6.3.2.2 Normalidade

Os testes mais comuns para comparação de dados nas avaliações de homogeneidade e estabilidade partem do pressuposto de normalidade, ou seja, o mensurando deve seguir uma distribuição normal. Essa premissa pode ser objeto de discussão profunda dentro das peculiaridades de cada análise e de cada mensurando. Processos com muitas grandezas envolvidas justificam-se pelo Teorema Central do Limite para supor a hipótese de normalidade. É possível também realizar testes de aderência à distribuição normal, mas com pouca quantidade de dados, é muito difícil evidenciar falta de normalidade salvo a existência de um ou dois *outliers* que provoquem uma assimetria significativa, a ponto de ser detectada pelo teste.

Na determinação de título para toxinas ou antitoxinas, o mesurando é obtido a partir de uma escala discreta e previamente planejada. Aparentemente, parece estranho supor normalidade para esta variável, porque um espaço amostral reduzido e discreto remete a uma distribuição uniforme discreta, como o lançamento de um dado. Porém, essa alusão é causada pela própria limitação do sistema de medição (escala e resolução). Desprezando a questão da viabilidade, o analista poderia construir o experimento com escalas quão grandes e resoluções tão melhores quanto ele desejasse. Seguindo este raciocínio, se os recursos tendessem para infinito, a distribuição do título seria contínua cujo domínio também tenderia para infinito, fato que traz características da distribuição Normal.

Ademais, de posse de uma amostra estatística com baixo número de graus de liberdade dentro da realidade dessa medição (menores que 10, por exemplo), e espaço amostral relativamente curto e discreto, é praticamente impossível que um teste de aderência rejeite a hipótese de normalidade. A justificativa é simples: não há como um resultado provocar assimetria suficiente porque todas as possibilidades para este resultado estão limitadas a um conjunto universo muito reduzido, e a variabilidade do processo é grande quando comparada a esse universo. Em outras palavras, mesmo que um resultado de medição fosse o primeiro valor da escala, e todos os outros resultados fossem iguais ao último, a limitação do tamanho da amostra ainda impediria uma eventual rejeição de normalidade.

Teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para um conjunto de resultados do título da toxina C, escolhido por sua aparente assimetria e maior valor de grau de liberdade, para aumentar a possibilidade de fuga da normalidade. O resultado mostrou não ser possível rejeitar a hipótese nula de normalidade. Em condições viáveis experimentais, seria razoável preparar até no máximo cinco diluições em condições de repetibilidade para cada amostra. Isso levaria a menores graus de liberdade e assimetria do conjunto pela melhor estabilidade do curto prazo, dificultando ainda mais a rejeição da hipótese nula.

Diante do exposto, este estudo foi fundamentado na premissa de normalidade para todos os conjuntos tratados.

6.3.2.3 Estudos de homogeneidade: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

O número ideal de amostras para um estudo de homogeneidade pode ser determinado através de técnicas de planejamento apoiadas estatisticamente. Embora a ABNT ISO GUIA 35 (2012) recomende o uso destas técnicas estatísticas, ela não as apresenta em seu conteúdo e indica que o número mínimo de frascos selecionados ao acaso deve se situar entre 10 e 30, e recomenda não ser menor que 10. Já o ISO GUIDE 35 (ISO, 2017) traz uma seção sobre esquemas de amostragem estatisticamente válidos. É importante que o planejamento de amostragem leve em consideração os pontos fracos potenciais no método de preparação das amostras (ABNT, 2012; ISO, 2017).

Em um estudo de homogeneidade, produzir resultados altamente exatos não é essencial, desde que o objetivo do exercício é avaliar a diferença (se existir alguma) nos valores de propriedade entre as unidades. Na prática, o material é frequentemente considerado como sendo homogêneo se a diferença entre uma porção do material e outra não pode ser detectada experimentalmente, isto é, a variação dentro da unidade e a variação unidade a unidade estão dentro da variância do método.

O desvio padrão de repetibilidade para o método utilizado no estudo de homogeneidade foi obtido pela análise de cinco alíquotas de um frasco do produto testado, uma vez. Conforme pode ser observado na Tabela 18, para todos os produtos, o desvio calculado $(\frac{s_r}{\sqrt{n_{al}}})$ foi inferior a um terço da incerteza padrão alvo (μ_{trg}), o que atesta o seu uso para esse estudo.

A homogeneidade dentro do frasco constitui uma questão somente quando os frascos podem ser subamostrados. Neste estudo, a heterogeneidade dentro do frasco pode ser efetivamente removida pela reconstituição do conteúdo, agitação e homogeneização antes da retirada da alíquota.

Tabela 18 – Cálculo do desvio padrão de repetibilidade do método e comparação com a incerteza padrão alvo, para os toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

Produto	Desvio-padrão intra-frasco (s_r)	$\frac{s_r}{\sqrt{n_{al}}}$	μ_{trg}	$\frac{\mu_{trg}}{3}$
Toxina botulínica tipo C	2,00	2,00	8	2,67
Antitoxina botulínica tipo C	4,18	4,18	10	3,33
Toxina botulínica tipo D	21,91	21,91	100	33,33
Antitoxina botulínica tipo D	0	0	10	3,33

s_r : Desvio-padrão intra-frasco obtido experimentalmente após análise de cinco alíquotas de um frasco do produto testado

n_{al} : nº de observações em cada uma das n alíquotas tomadas de cada unidade para medição, neste caso igual a 1

μ_{trg} : incerteza padrão alvo

O delineamento mais comumente utilizado para verificar a homogeneidade entre frascos, consiste na realização de ensaios intra-frascos e inter-frascos, e posterior análise de dados por análise de variância (ANOVA). No entanto, a execução de todas as determinações necessárias a esta análise estatística, demandaria um grande número de animais, e conseqüentemente um número grande de inoculações em um curto espaço de tempo, o que inviabilizou a adoção deste leiaute. Considerando estes aspectos e visando utilizar o menor número possível de animais, foi adotado um modelo alternativo.

O modelo desenvolvido foi baseado no Método dos Mínimos Quadrados Ordinário (MMQO), cujas premissas básicas são: 1) a variável independente tem incerteza nula ou desprezível; 2) os níveis da variável dependente têm variâncias estatisticamente iguais. É razoável supor que existe essa homocedasticidade porque as amostras vieram do mesmo processo realizado sob controle rigoroso de qualidade, do mesmo lote, e supostamente tratam-se do mesmo mensurando.

O objetivo do MMQO é minimizar o quadrado das distâncias entre cada resultado experimental de título e seu respectivo valor previsto pela função afim modelada. Dessa forma, espera-se que um material homogêneo apresente medições aproximadamente iguais em cada replicata, o que significa que a inclinação da reta ajustada seria estatisticamente nula. Por outro lado, um material heterogêneo provavelmente apresentaria resultados significativamente diferentes entre os frascos, e a inclinação da reta seria diferente de zero.

Outro aspecto ímpar da análise de título de toxinas e antitoxinas botulínicas é o fato de não ser possível detectar *outliers* por teste de hipótese. O conjunto de possibilidades de resultado é finito, discreto, e limitado exatamente à quantidade de níveis de diluições preparados. Se um resultado eventualmente estiver fora da faixa de diluições, ele é automaticamente inválido e sequer pode ser medido. Portanto, pela lógica do processo, torna-se inútil realizar qualquer teste de hipótese com o objetivo de evidenciar a presença de *outliers* nessas condições.

Nos Gráficos 1 a 4 estão apresentadas as curvas e as replicatas das medições obtidas nos estudos de homogeneidade, para os produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017). Os resultados individuais das medições estão apresentados no Anexo 2.

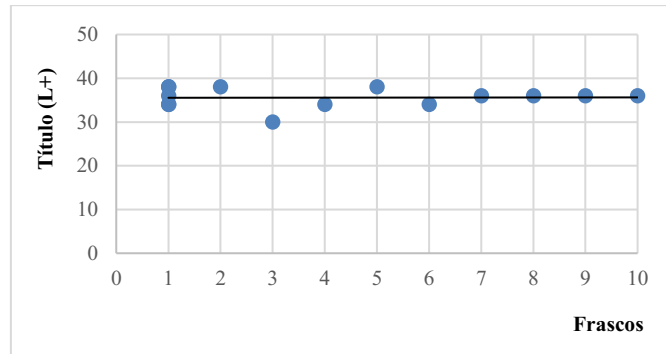


Gráfico 1 – Resultados de título (em L+) obtidos no estudo de homogeneidade da toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos

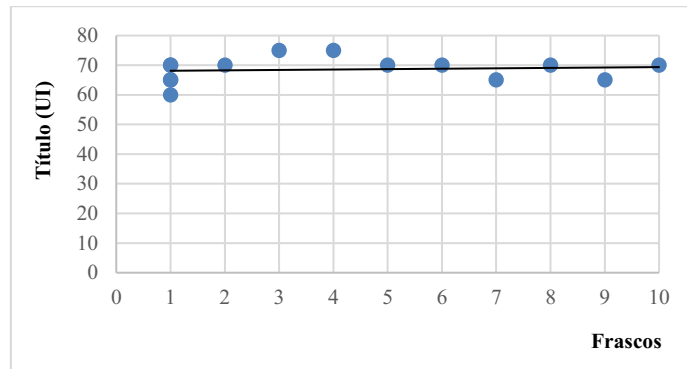


Gráfico 2 – Resultados de título (em UI) obtidos no estudo de homogeneidade da antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos

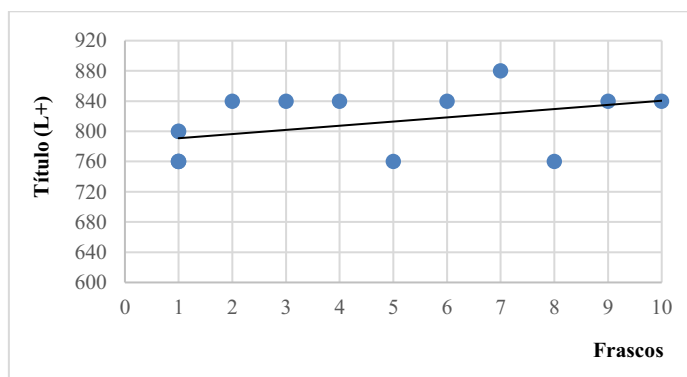


Gráfico 3 – Resultados de título (em L+) obtidos no estudo de homogeneidade da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos

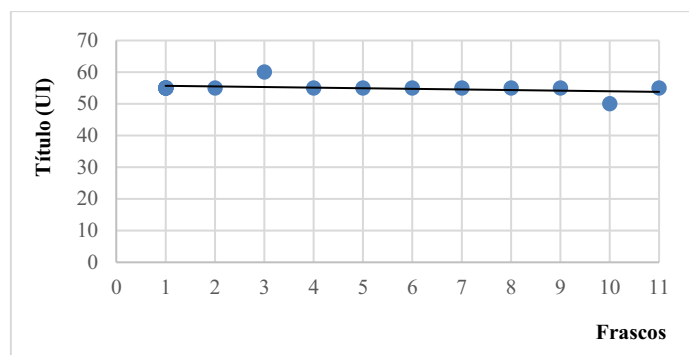


Gráfico 4 – Resultados de título (em UI) obtidos no estudo de homogeneidade da antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), utilizando 10 frascos, sendo o primeiro em quintuplicata e os demais em unicatas, determinados por bioensaio em camundongos

A inclinação da curva ordinária foi testada supondo que este parâmetro segue uma distribuição normal. A regressão linear e o teste de hipótese para a inclinação β_i visam mostrar se existe alguma tendência crescente ou decrescente entre os resultados de cada frasco, com base na própria variabilidade estimada pelo modelo, que permita evidenciar heterogeneidade.

Usar a regressão linear é vantajoso para detectar tendências, principalmente com conjuntos de resultados onde o desvio-padrão de repetibilidade é nulo, o que seria uma forte limitação para o uso da ANOVA ou teste T, por exemplo. Ademais, a produção de material de referência tem elevados custos tangíveis e intangíveis por retirada de amostra, o que reforça a justificativa de usar métodos estatísticos que sentem menos o efeito de um grau de liberdade pequeno. Entretanto, o risco da análise de regressão existe na possibilidade de uma elevada flutuação entre os frascos trazer uma incerteza muito grande para β_i , omitindo uma eventual tendência dos resultados e prejudicando a assertividade da decisão de homogeneidade.

A Tabela 19 mostra a relação dos parâmetros inclinação (β_i), incerteza-padrão da inclinação (sb_i) e limite discriminante (L) para cada produto. Os cálculos estão apresentados no Anexo 2.

Tabela 19 - Parâmetros estatísticos de inclinação (β_i), incerteza-padrão da inclinação (sb_i) e limite discriminante (L), calculados a partir das curvas obtidas nos estudos de homogeneidade dos produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), interpretação do teste estatístico a respeito da homogeneidade do produto e parecer final sobre sua aceitação

Produto/Parâmetro	Inclinação (β_i)	Incerteza-padrão (sb_i)	Limite (L)	Resultado teste estatístico	Parecer final
Toxina C	0,009	0,197	-0,314	HOMOGÊNEO	ACEITÁVEL
Antitoxina C	0,137	0,360	-0,454	HOMOGÊNEO	ACEITÁVEL
Toxina D	5,517	3,332	0,052	HETEROGÊNEO*	ACEITÁVEL
Antitoxina D	-0,191	0,135	0,030	HOMOGÊNEO	ACEITÁVEL

*dentro do limite aceitável.

A discussão do resultado da homogeneidade segue o preceito da norma ISO GUIDE 35 (ISO, 2017), que sugere uma tolerância a certo nível de heterogeneidade, desde que esse nível não afete significativamente a diferença entre resultados e a majoração da incerteza do valor estimado, induzindo decisões equivocadas de conformidade.

Os resultados para três dos quatro produtos estudados evidenciaram homogeneidade do material. Para as Antitoxinas C e D, é interessante notar que as incertezas têm mesma ordem de

grandeza que as próprias inclinações, que, por sua vez, são muito menores que os respectivos interceptos da função ajustada. Para a toxina C, a incerteza chega a ser uma ordem de grandeza acima da inclinação. Isso reforça o resultado que aponta no sentido de que a variabilidade das medições não permite evidenciar tendência no resultado. Já para a Toxina D, há evidência de heterogeneidade. Neste caso, a regressão conseguiu detectar uma tendência de crescimento para os demais frascos com relação às replicatas de frasco único. Ainda assim, o limite calculado para esse produto $L = 0,052$ é muito próximo de zero, sugerindo que a heterogeneidade acusada pode não ser significativa em relação à própria incerteza esperada da medida, a ponto de enviesar os resultados.

Para confirmar essa tese, utilizou-se o critério que estima a variação inter-frascos, s_{bb} , descrito por Van der Veen *et al.* (2001a) e o comparou com um desvio-padrão alvo para homogeneidade previamente estabelecido para decisão de tolerância. Para avaliar a “homogeneidade suficiente” em termos percentuais, os desvios padrão intra-frascos e inter-frascos foram convertidos em coeficientes de variação (CV), considerando a média de cada grupo, e os resultados estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Cálculo do desvio desvio-padrão de homogeneidade (s_{bb}) utilizando modelo alternativo.

	Resultados inter frasco	Resultados intra frasco
Média	827	776
Desv. Pad	40,00	21,91
CV (%)	4,84	2,82
CV_{bb}	$\sqrt{4,84^2 - 2,82^2} = 3,93\%$	

O coeficiente de variação da homogeneidade para a toxina D resultou em aproximadamente 4%, dentro da margem de tolerância de 10%, adotada para esses produtos.

6.3.2.4 Estudos de estabilidade: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

O estudo de estabilidade tem o objetivo de evidenciar alterações naturais e significativas no mensurando com o passar do tempo sob diferentes níveis de temperatura, simulando situações de transporte e armazenamento do material de referência. Estabilidade é a característica relacionada à inexistência de diferença estatística dos dados do conjunto quando estes são obtidos ao longo do tempo.

Nesse estudo, a escolha do leiaute clássico, ou seja, sob condições de reprodutibilidade, embora possa levar a um aumento da incerteza do material, quando comparada ao estudo isócrono, se fez necessária por ser inviável processar, ao mesmo tempo, todas as amostras coletadas.

Nos Gráficos 5 a 8 estão apresentadas as curvas e as replicatas das medições obtidas nos estudos de estabilidade a curto e longo prazos, para os produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017). Os resultados individuais das medições estão apresentados no Anexo 2.

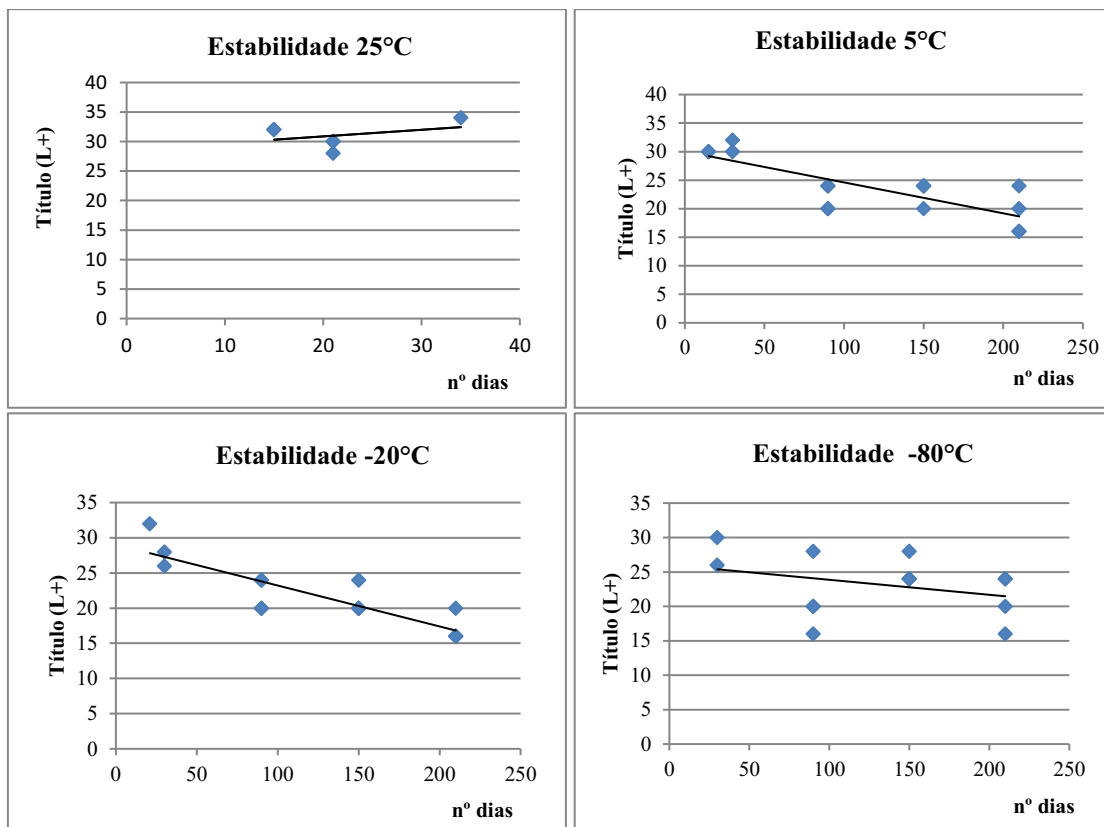


Gráfico 5 – Resultados de título (em L+) para a toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (34 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (210 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos

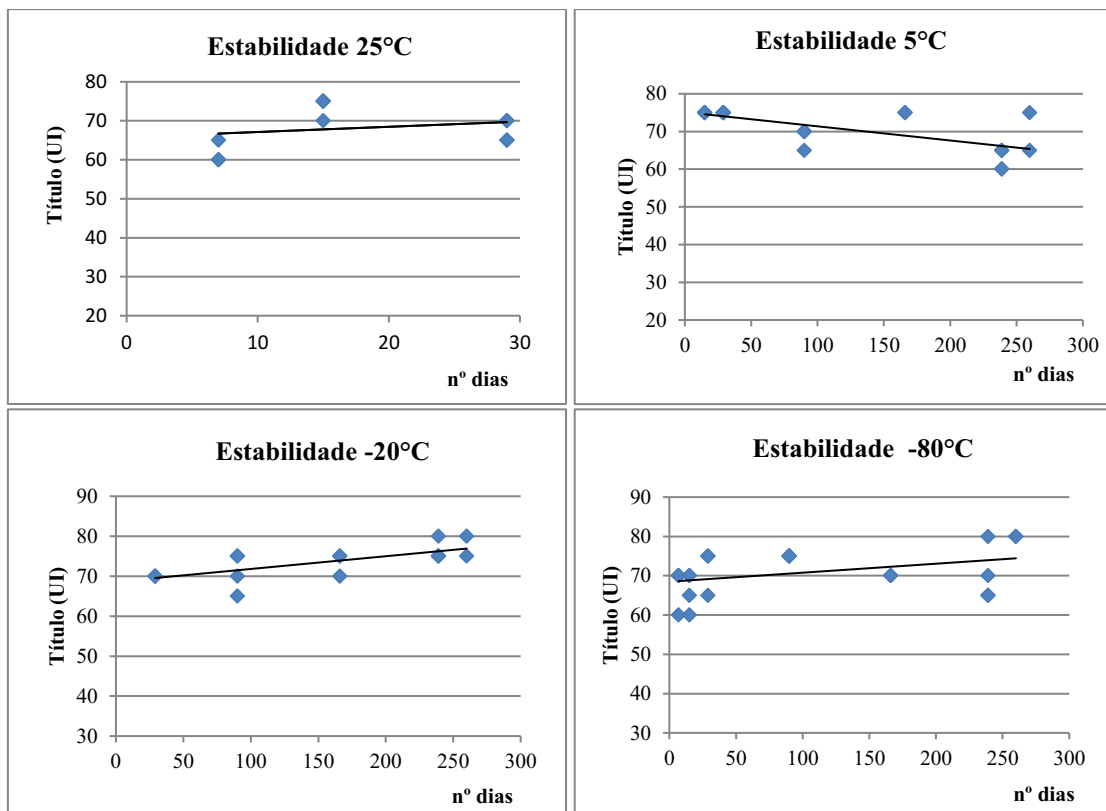


Gráfico 6 – Resultados de título (em UI) para a antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (29 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (260 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos

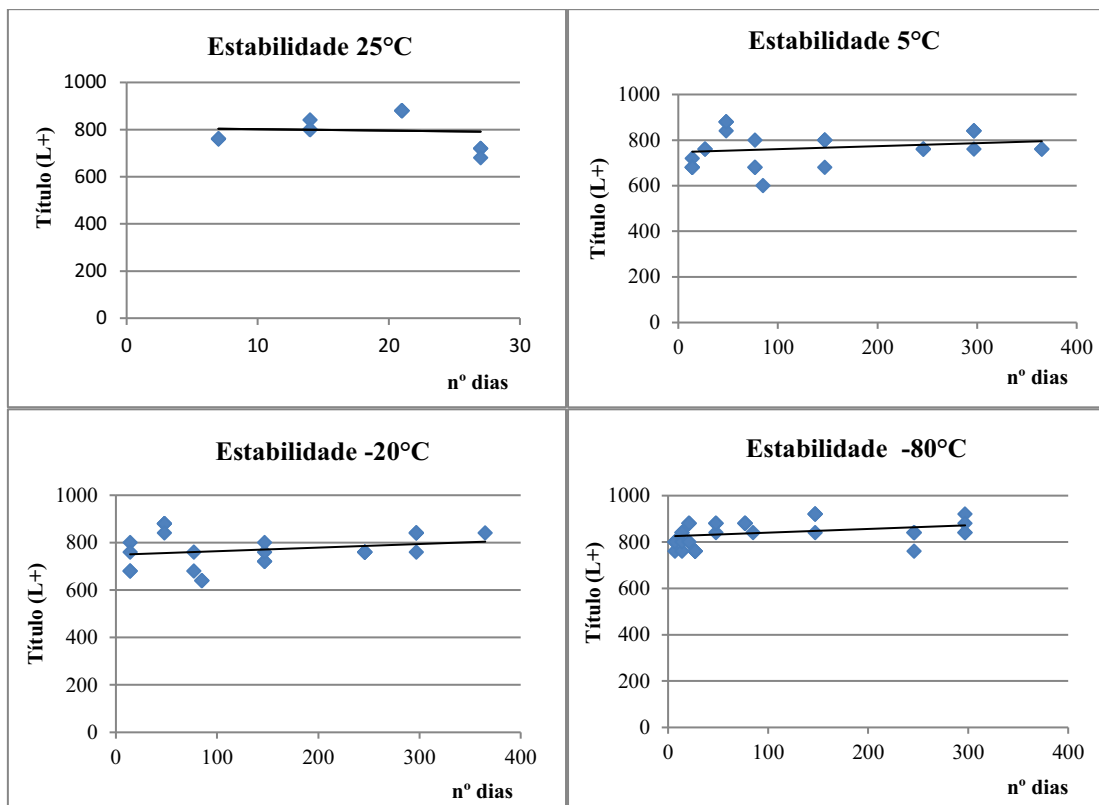


Gráfico 7 – Resultados de título (em L+) para a toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (27 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (365 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos

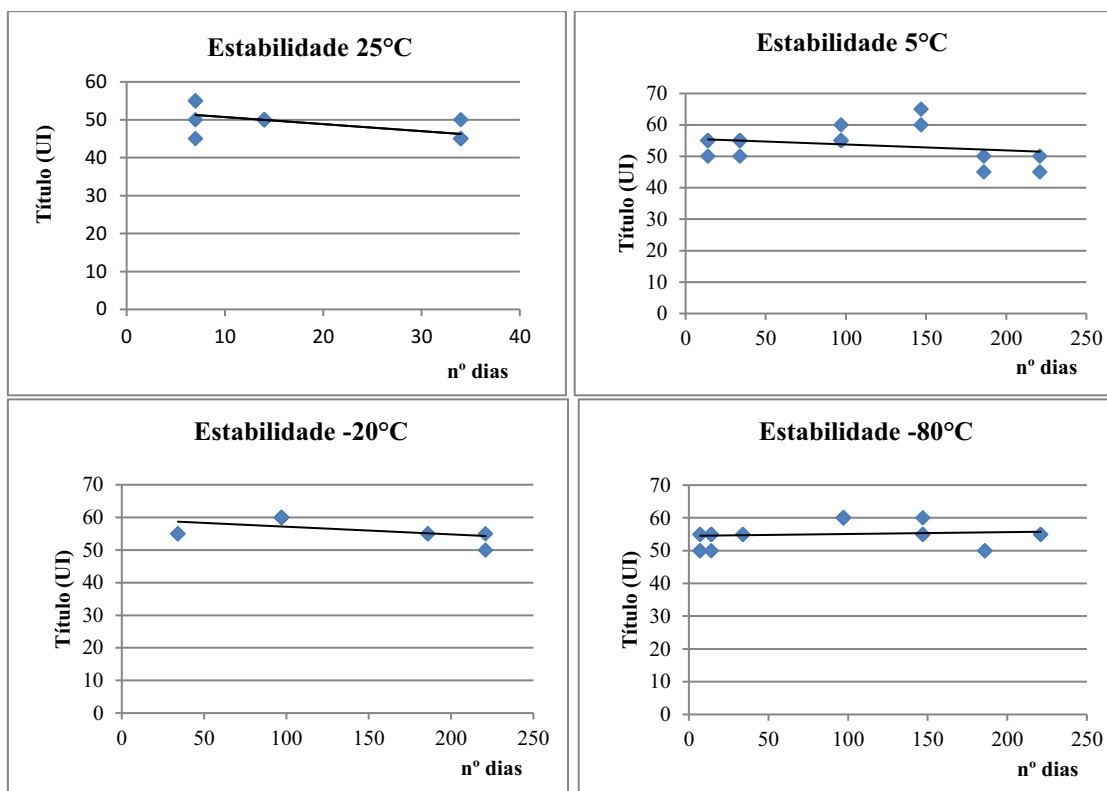


Gráfico 8 – Resultados de título (em UI) para a antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) obtidos nos estudos de estabilidade de curto prazo (34 dias) na temperatura de 25°C e de longo prazo (221 dias) nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C, determinados por bioensaio em camundongos

As ferramentas aplicadas foram o teste da inclinação estimada pelo Método dos Mínimos Quadrados com as mesmas considerações que foram feitas para o estudo de homogeneidade. Portanto, o fato de a inclinação da curva, estudada a uma dada temperatura, ser diferente de zero seria indicativo de uma alteração no mensurando, e de não ser recomendado conservar o material naquela condição.

A Tabela 21 mostra os parâmetros para o estudo de estabilidade para cada produto em cada nível de temperatura. Os cálculos estão apresentados no Anexo 2.

Cada combinação de produto e temperatura tem seu modelo de regressão para testar a estabilidade do material naquela condição. Entretanto, a discussão dos resultados não deve levar em consideração apenas aspectos individuais de cada curva, mas também a coerência científica entre elas. Isto decorre de que não é desejável reproduzir os resultados da estatística sem senso crítico e tomar conclusões precipitadas, sendo que a melhor prática é conectar tais resultados com fatos observados de preferência cientificamente justificáveis, construindo uma conclusão mais segura e coerente.

Tabela 21 - Parâmetros estatísticos de inclinação (β_i), incerteza-padrão da inclinação (s_{b_i}) e limite discriminante (L), calculados a partir das curvas obtidas nos estudos de estabilidade a curto e longo prazos, nas temperaturas de 25°C, 5°C, -20°C e -80°C, para os produtos: toxina botulínica tipo C (Lote 01/2016), antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017) e antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), interpretação do teste estatístico a respeito da estabilidade do produto e parecer final sobre sua aceitação.

PARÂMETROS							
Produto	Temperatura do estudo	Inclinação (β_i)	Incerteza-padrão (s_{b_i})	Limite (L)	Nº dias estudo	Resultado teste estatístico	Parecer final
Toxina C	25 °C	0,112	0,140	-0,118	34	ESTÁVEL	INACEITÁVEL
	5 °C	-0,054	0,011	-0,036	210	INSTÁVEL	INACEITÁVEL
	-20 °C	-0,058	0,009	-0,043	210	INSTÁVEL	INACEITÁVEL
	-80 °C	-0,022	0,018	0,008	210	ESTÁVEL	INACEITÁVEL
Antitoxina C	25 °C	0,134	0,194	-0,184	29	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	5 °C	0,000	0,050	0,082	29	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	5 °C	-0,038	0,010	-0,021	260	INSTÁVEL	INACEITÁVEL
	-20 °C	0,032	0,009	0,018	260	INSTÁVEL	INACEITÁVEL
Toxina D	25 °C	-0,613	2,648	3,730	27	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	5 °C	0,131	0,120	-0,066	365	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	-20 °C	0,151	0,131	-0,063	365	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	-80 °C	0,159	0,081	0,025	297	INSTÁVEL*	ACEITÁVEL
Antitoxina D	25 °C	-0,186	0,075	-0,063	34	INSTÁVEL	INACEITÁVEL
	5 °C	-0,019	0,016	0,008	221	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	-20 °C	-0,023	0,015	0,000	221	ESTÁVEL	ACEITÁVEL
	-80 °C	0,006	0,010	-0,011	221	ESTÁVEL	ACEITÁVEL

* A instabilidade estatística detectada não impactou na aceitabilidade do produto armazenado a -80 °C.

A toxina botulínica tipo C apresentou estabilidade de curto prazo (34 dias) a 25°C e de longo prazo (210 dias) a -80°C. Nas outras temperaturas estudadas, 5°C (210 dias) e -20°C (210 dias), houve perda de estabilidade aparentemente a partir do 3º período estudado (90 dias). Além da instabilidade desse produto na temperatura usualmente recomendada para o seu armazenamento (-20°C), já se havia constatado o não atendimento ao critério de título mínimo em uma dose teste (como descrito no Capítulo 2). Tal constatação confirma que o critério de no mínimo 400 DMM em uma dose teste, estabelecido no protocolo Onderstepoort, [199?], é adequado para controlar a produção de toxinas botulínicas candidatas a MR. E, diante disso, foi descartada a possibilidade da toxina botulínica tipo C produzida nesse trabalho ser um MR.

O teste de Estabilidade para a Antitoxina C evidenciou estabilidade para a temperatura de 25°C por 30 dias. Para a temperatura de 5°C, o 1º, 2º e 4º níveis apresentaram desvio padrão de repetibilidade nulo, portanto as variâncias nesses níveis ficaram sem estimativa, omitindo informação que poderia induzir a rotação da curva. De toda forma, observou-se que o produto apresenta estabilidade a 5°C por 29 dias, podendo ser recomendado seu transporte sob refrigeração. No estudo a -20°C por 260 dias, o teste estatístico acusou instabilidade. Nesse caso, poderíamos propor uma tabela de correção do valor do título ao longo do tempo, baseado na incerteza associada a inclinação (s_{b_i}). Porém, o que ocorre é um crescimento aparente, o que não seria esperado para o produto. Especula-se que o monitoramento por um tempo maior nessa condição de temperatura demonstrará sua estabilidade. Já na temperatura de -80°C por 260 dias, o limite do teste estatístico, ficou igual a zero (0,00) demonstrando estabilidade. Concluiu-se, portanto, que a Antitoxina botulínica tipo C é estável a 25°C e a 5°C por pelo menos 30 dias, e é estável a -80°C por pelo menos 260 dias.

O teste para a toxina D indicou estabilidade para todas as temperaturas, exceto a -80°C, onde a instabilidade aparente também ocorreu provavelmente devido à falta de representatividade na variabilidade de alguns níveis mensurados, principalmente nos 4º e 6º

níveis da toxina, onde o desvio-padrão amostral foi nulo. Nesse caso, não parece seguro rejeitar a hipótese de estabilidade, ainda que o critério aponte para tal decisão, não por motivo da estatística em si, mas sim à falta de justificativa científica para o evento descrito, principalmente o aumento do título da toxina D na temperatura de maior estabilidade esperada, -80°C. Dessa forma, concluímos que o produto Toxina botulínica tipo D é estável a 25°C por pelo menos 27 dias, e é estável nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C por pelo menos 297 dias.

Para a antitoxina botulínica tipo D, os níveis que mantiveram estabilidade foram de 5°C, -20°C e -80°C, faltando evidência de estabilidade a 25°C. Nessa temperatura (25°C), também houve falta de representatividade na variabilidade do 2º nível mensurado, onde o desvio-padrão amostral foi nulo. Concluiu-se, portanto, que a antitoxina botulínica tipo D é estável nas temperaturas de 5°C, -20°C e -80°C por pelo menos 221 dias.

Em suma, concluiu-se que a toxina botulínica tipo C não deveria prosseguir para a etapa de caracterização e certificação como MR, devendo ser produzido um novo lote que atenda ao critério mínimo de título. Concluiu-se também que a toxina botulínica tipo D e as antitoxinas botulínicas tipo C e D eram potenciais candidatos a MRC, e que deveriam ser inseridas na etapa de caracterização. Recomendou-se que o transporte desses produtos fosse feito sob refrigeração, dentro de um intervalo de no máximo de 30 dias, evitando gastos desnecessários com transporte em condições de congelamento. Foi ainda recomendado que o armazenamento pelo usuário fosse realizado em temperaturas iguais ou inferiores a -20°C, exceto para a antitoxina botulínica tipo C, cujo armazenamento recomendado foi a -80°C. No produtor, recomendou-se o armazenamento de todos os produtos a -80°C e o monitoramento durante o período de validade estabelecido.

6.3.2.5 Estudo de caracterização: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

Todos os sete laboratórios participantes do estudo colaborativo relataram ter recebido os materiais, bem como a documentação enviada de forma adequada. A participação do LAB001 não foi possível devido a ocorrência de problemas burocráticos e logísticos relacionados a remessa de materiais de alto risco, que impediram a remessa dos itens nos prazos estabelecidos no cronograma do estudo.

Os resultados dos participantes estão apresentados nas Tabelas 22 a 24.

Tabela 22 – Resultados de título (em UI) obtidos para a antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios

Código do participante	Resultados de título (UI)		
	R1	R2	R3
LAB002	55	55	60
LAB003	45	40	40
LAB004	55	55	55
LAB005	50	50	50
LAB006	60	60	60
LAB007	60	60	60
LAB008	65	65	*

R: Replicata

* Ausência de resultado válido

Tabela 23 – Resultados de título (em L+) obtidos para a toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios

Código do participante	Resultados de título (L+)		
	R1	R2	R3
LAB002	1000	1000	1000
LAB003	800	800	800
LAB004	*	1000	1000
LAB005	*	*	*
LAB006	900	900	800
LAB007	900	1000	900
LAB008	1100	*	*

R: Replicata

* Ausência de resultado válido

Tabela 24 – Resultados de título (em UI) obtidos para a antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), por bioensaio em camundongos, na etapa de caracterização realizada por estudo colaborativo com participação de sete laboratórios

Código do participante	Resultados de título (UI)		
	R1	R2	R3
LAB002	40	40	40
LAB003	50	50	50
LAB004	50	50	50
LAB005	*	*	*
LAB006	60	60	65
LAB007	50	50	50
LAB008	50	50	*

R: Replicata

* Ausência de resultado válido

Como o conjunto de dados tem uma distribuição normal, então a média das médias foi a escolha para o valor da caracterização.

A rastreabilidade dos resultados de valor de propriedade foi assegurada por dois pontos-chave:

- as medições foram realizadas por um método oficial normalizado (Brasil, 2002), com equipamentos apropriadamente calibrados, pessoal treinado e condições experimentais controladas;

- os valores de propriedade foram estabelecidos tendo como referência padrões de toxina ou antitoxina botulínica homólogos do MAPA.

6.3.2.6 Previsão da validade: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

Análises estatísticas preditivas foram realizadas e o tempo de validade encontrado variou de 533 a 614 dias, contados do início dos estudos de estabilidade, e de 249 a 318 dias após a conclusão dos estudos de estabilidade, conforme apresentado na Tabela 25. Já os tempos

de validade a partir da data de produção foram de: 768 dias para antitoxina botulínica tipo C, 852 dias para toxina botulínica tipo D e 802 dias para antitoxina botulínica tipo D, ou seja, um pouco mais de dois anos para os três produtos.

Para os três produtos testados foi estabelecida a validade de um ano (365 dias) após o término dos estudos de estabilidade, para fins de cálculo da incerteza da estabilidade de longo prazo e rotulagem. A proposta de ampliação, em alguns meses (de um a quatro meses, dependendo do produto), da validade rotulada em relação à validade teórica é segura e considerou os seguintes aspectos: a inclusão da incerteza da estabilidade a longo prazo no cálculo da incerteza final do MRC, considerando 365 dias (um ano após o fim dos testes de estabilidade); o histórico de uso desses materiais que sugere que a estabilidade é possivelmente superior àquela calculada teoricamente; a tendência dos métodos de cálculos teóricos superestimarem as variações, trabalhando sempre com o pior caso; e por fim, a garantia que os produtos serão monitorados pelo produtor ao longo do seu período de validade.

Tabela 25 – Previsão de tempos de validade para os produtos: antitoxina botulínica tipo C, toxina botulínica tipo D e antitoxina botulínica tipo D, utilizando modelo de previsão de limites superior e inferior com tendência linear

	Média	U máx. estabelecida	Limite superior		Limite inferior		Tempo de validade previsto (em dias)		
			b ₁	b ₀	b ₁	b ₀	Ao início teste estabilidade		Ao fim do teste estabilidade
							Superior	Inferior	
Antitoxina botulínica tipo C	71	20	0,0416	82,77	0,0041	54,193	533	-317	273
Antitoxina botulínica tipo D	56	20	-0,0206	64,923	-0,0264	54,046	8312	539	318
Toxina botulínica tipo D	766	200	2,1644	3191	-1,8615	-1693,4	2044	614	249

Na Tabela 26 estão apresentadas as datas de produção, validade teórica calculada pelo método proposto pelo ISO Guide 35 (ISO, 2017) e a validade rotulada para os produtos.

Tabela 26 – Data de produção e validades teórica e rotulada para a antitoxina botulínica tipo C, toxina botulínica tipo D e antitoxina botulínica tipo D

	Data de produção	Data de validade teórica	Validade rotulada
Antitoxina botulínica tipo C	03/07/2017	09/08/2019	Set/2019
Antitoxina botulínica tipo D	10/07/2017	20/09/2019	Nov/2019
Toxina botulínica tipo D	16/01/2017	18/05/2019	Set/2019

Havendo evidências de manutenção da integridade do material, durante os estudos de monitoramento, o produtor poderá revisar o prazo de validade e comunicar aos usuários que adquiriram ou receberam o produto.

6.3.2.7 Estimativas das incertezas: MRC de toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

O estabelecimento de um modelo apropriado para um valor de propriedade de um candidato a MRC constitui tarefa complexa. Um dos requisitos básicos do modelo consiste em incluir todos os fatores que poderiam contribuir de forma significativa para a incerteza associada aos valores de propriedade do MRC. Portanto, para ser completa, a incerteza-padrão combinada deve considerar a homogeneidade, ambas as estabilidades, a curto e longo prazo, além da incerteza do valor certificado obtida na caracterização.

Com evidências estatísticas de uniformidade dos produtos, a incerteza da homogeneidade poderia ser considerada não significativa e não ser incluída no cálculo da incerteza do MRC. No entanto, para os produtos deste trabalho, optou-se por incluir na incerteza do valor certificado, uma permissão para qualquer heterogeneidade detectada (μ_{hom}). Segundo O ISO Guide 35 (ISO, 2017), μ_{hom} não deve ser inferior ao desvio padrão entre frascos determinado por estudos experimentais de homogeneidade. E neste sentido, esse desvio foi utilizado para compor a incerteza final dos MRCs.

A incerteza da estabilidade do MRC foi estimada conforme proposto por Linsinger *et al.* (2001), no tempo de prateleira ou transporte propostos. Considerando os resultados do teste de estabilidade, a temperatura recomendada para armazenamento dos produtos foi de -20°C ou inferior, e o período de validade dos produtos, que foi estabelecido em um ano após o último teste de estabilidade realizado.

A incerteza da caracterização (u_{car}) utilizou o desvio padrão da média de p laboratórios que enviaram os resultados no estudo colaborativo organizado.

As Tabelas 27 a 29 mostram as estimativas dos resultados de título dos produtos testados considerando a caracterização realizada por estudo colaborativo, e as estimativas dos valores de incerteza-padrão obtidas nos estudos de caracterização, homogeneidade e estabilidade a curto e longo prazos.

Tabela 27 - Estimativa do valor de propriedade (título) da antitoxina botulínica tipo C (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida

Estudos para certificação	Valor	Incerteza-padrão	Incerteza-expandida
Caracterização	55	2,9	
Homogeneidade	0	3,6	
Estabilidade e.c. (5°C)	0	0,3	
Estabilidade e.l. (-80°C)	0	4,5	
Resultado (independência) =	55	± 6	± 13
Resultado (correlação 0,5) =	55	± 9	
Valor para rotulagem	55 ± 13		

Tabela 28 - Estimativa do valor de propriedade (título) da toxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida

Estudos para certificação	Valor	Incerteza-padrão	Incerteza-expandida
Caracterização	950	44	
Homogeneidade	0	41	
Estabilidade e.c. (5°C)	0	3,6	
Estabilidade e.l. (-20°C)	0	48	
Resultado (independência) =	950	± 77	± 153
Resultado (correlação 0,5) =	950	± 110	
Valor para rotulagem	950 ± 153		

Tabela 29 - Estimativa do valor de propriedade (título) da antitoxina botulínica tipo D (Lote 01/2017), composto pelo valor obtido na caracterização, contribuições dos valores de incerteza-padrão dos estudos, resultados finais considerando a hipótese de independência e de correlação igual a 0,5, e finalmente o valor para rotulagem do MRC com a incerteza expandida

Estudos para certificação	Valor	Incerteza-padrão	Incerteza-expandida
Caracterização	50	2,8	
Homogeneidade	0	2,2	
Estabilidade e.c. (5°C)	0	0,5	
Estabilidade e.l. (-20°C)	0	5,3	
Resultado (independência) =	50	± 6	± 13
Resultado (correlação 0,5) =	50	± 9	
Valor para rotulagem	50 ± 13		

Nesse trabalho, foram calculadas estimativas de incerteza para os três produtos, considerando as duas abordagens para a modelagem da variável: uma sob hipótese de independência, e outra sob hipótese de correlações iguais a 0,5 entre as grandezas de entrada.

A combinação das incertezas que contemplaram as correlações, resultou numa incerteza-padrão maior que a estimada sob hipótese de independência, revelando alguma redundância do modelo. É importante não desprezar o fato de que a Equação de Welch-Satterthwaite (JCGM, 2008), utilizada para estimar o grau de liberdade efetivo e a incerteza expandida do resultado só poderia ser aplicada sob a condição de independência entre as variáveis, por isso a comparação foi realizada entre as incertezas-padrão combinadas.

Para fins de rotulagem dos MRCs foram considerados os resultados do modelo sob hipótese de independência, conforme preconiza o ABNT ISO GUIA 35 (2012). Apesar da simulação de correlação ter indicado resultados diferentes entre considerar ou não tal hipótese, ainda não é possível confirmar empiricamente a existência das correlações entre as grandezas de entrada.

Outro ponto importante a ser considerado é que na composição da incerteza do MRC há uma redundância em algumas incertezas como por exemplo, a da caracterização que já traz embutida em si, as variâncias da homogeneidade e da estabilidade. Isso não necessariamente representa um problema, mas sim um ponto de atenção para a análise crítica do resultado final obtido.

As incertezas obtidas para os MRCs desenvolvidos neste trabalho embora possam parecer elevadas, para alguns leitores, não representam problema para o uso desses materiais no controle de vacinas anti-botulínicas. Isso porque as faixas abrangidas pelas incertezas são bem inferiores aos próprios intervalos de diluições estabelecidos no método oficial (ou seja, 1 UI, 2,5 UI e 5 UI).

Concluindo, o valor rotulado do título foi estabelecido como o título médio obtido pela caracterização, associado à incerteza-padrão combinada da homogeneidade, ambas as estabilidades, e caracterização, convertida em incerteza expandida ($k=2$).

6.3.3 Instruções de uso e rotulagem

Quando um material de referência é fornecido, ele deve ser acompanhado de um documento com informações sobre seu uso, incluindo:

- informações sobre sua composição e método de preparação;
- seu valor de propriedade (por ex. potência) e os métodos usados para atribuição do valor;
- tipo de ensaios em que pode ser utilizado;
- condições de armazenamento e envio;
- instruções sobre a reconstituição, quando aplicável;
- informações sobre a estabilidade do MR nas condições de armazenamento e transporte;
- informações de contato para comentários sobre quaisquer questões relacionadas ao uso, qualidade ou estabilidade do padrão;
- ficha de segurança do produto.

O uso para outros fins nem sempre é possível ou aconselhável, e o produtor deverá estar disposto a aconselhar os usuários sobre este assunto (Castle, 1998).

Todas as ampolas ou frascos do padrão devem ser rotulados com o nome do produtor ou distribuidor, o nome do material, temperatura de armazenamento, e validade, quando necessário. A WHO (2011) recomenda ainda que padrões biológicos devem conter a inscrição “Não é para uso em humanos”.

Modelos de certificados para os MRCs certificados neste trabalho estão apresentados no Anexo 3.

6.4 Conclusão

Lotes de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D, suficientemente homogêneos e estáveis puderam ser produzidos e certificados. A confirmação da identidade e a caracterização fenotípica e genotípica das estirpes CBC 02 e CBD 09, permitiram atribuir a elas, informações de rastreabilidade suficientes, conforme exigido pelas normas de Sistemas de Gestão da Qualidade, podendo os mesmos serem classificados como MRCs.

As informações relacionadas à qualidade e rastreabilidade dessas estirpes podem ainda ser utilizadas como ferramentas para validar lotes de toxinas botulínicas, produzidos anteriormente a partir desses mesmos insumos, agregando valor intangível ao material.

As toxinas botulínicas e antitoxinas botulínicas tipos C e D submetidas à certificação não apresentaram heterogeneidade suficiente para invalidar os lotes produzidos. Quanto à estabilidade, avaliada cautelosamente pela análise de regressão no binômio tempo-temperatura, conclui-se que três dos quatro produtos estavam aptos a se tornarem MRCs: a antitoxina botulínica tipo C, a toxina botulínica tipo D e a antitoxina botulínica tipo D. Para a toxina botulínica tipo C, há necessidade de um novo planejamento, dado que a instabilidade foi apontada com boa margem de segurança.

6.5 Perspectivas futuras

Realizar uma nova produção e estudos de homogeneidade e estabilidade para a toxina botulínica tipo C.

Complementar o estudo de estabilidade das estirpes bacterianas, em outras temperaturas de armazenamento, incluindo aquelas que poderão ocorrer durante o transporte do material.

Complementar o estudo das toxinas e antitoxinas com informação sobre a estabilidade, após serem reconstituídas, diluídas e aliquotadas.

Continuar o monitoramento dos materiais aprovados, com vistas a avaliar seu comportamento e, se possível, ampliar seu período de validade.

Desenvolver e produzir um painel de MRs de DNA genômico de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C, D, C/D e D/C, para uso em diagnósticos por PCR e para outras aplicações de biologia molecular.

Ampliar a aplicação do protocolo de certificação estudado neste trabalho, para outras estirpes, toxinas e materiais biológicos mantidos no acervo do LFDA, com potencialidade de se tornarem MRCs.

7. CONCLUSÃO

- Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D produtoras de toxinas foram caracterizadas fenotípica e genotipicamente, e foram aprovadas nos estudos de homogeneidade e estabilidade, sendo possível classificá-las como materiais de referência certificados (MRCs);
- Toxinas e antitoxinas botulínicas foram produzidas, com títulos adequados ao uso pretendido conforme critérios adotados pelo MAPA, e foram aprovadas nos estudos de homogeneidade e estabilidade, exceto a toxina botulínica tipo C;
- A toxina botulínica tipo D e as antitoxinas botulínicas tipos C e D, foram caracterizadas por estudo colaborativo, com determinação de seus respectivos valores de propriedade e incertezas associadas, sendo possível classificá-las como materiais de referência certificado (MRCs);
- Os MRs e MRCs produzidos neste estudo foram incorporados ao banco de materiais de referência do LFDA-MG, podendo ser disponibilizados a outros órgãos reguladores, institutos de pesquisa, laboratórios e indústrias veterinárias que atuem no segmento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SALEEM, F. H *et al.* Analysis of the mechanisms that underlie absorption of botulinum toxin by the inhalation route. **Infection and Immunity**, v.80, n.12, p. 4133-4142, 2012.
- ALVES, G. G. *et al.* Outbreak of type C botulism in chickens in Pancas city, Espírito Santo state, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.1, p.355-358, 2013.
- AMIMOTO, K. *et al.*, 2006. Genetic variation and cross-reactivity of *Clostridium septicum* alpha-toxin. **Veterinary Microbiology**, v.114, n.1-2, p.51-59, 2006.
- ANNIBALLI F. *et al.* New targets in the search for preventive and therapeutic agents for botulism. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.12, n.9, p.1075–1086, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO 17034**. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2017. 27 p. (b)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 30**. Materiais de referência - Termos e definições selecionados. Rio de Janeiro, 2016. 9 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 31**. Materiais de referência – Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. Rio de Janeiro, 2017. 11 p. (a)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 35**. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012. 73 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 5426**. Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos. Rio de Janeiro, 1989. (a)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 5428**. Procedimentos estatísticos para determinação da validade de inspeção por atributos feita pelos fornecedores. Rio de Janeiro, 1989. (b)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 5429**. Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por variáveis. Rio de Janeiro, 1998.
- BALDWIN, M. R. *et al.* Subunit Vaccine against the Seven Serotypes of Botulism. **Infection and Immunity**, v.76, n.3, p.1314–1318, 2008.
- BARASH, J. R.; ARNON, S. S. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209, p.183-191, 2014.
- BAUME, M. *et al.* The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, n.6, p.1725-1733, 2013.

BERNTSSON, R. P. *et al.* Crystal structures of botulinum neurotoxin DC in complex with its protein receptors synaptotagmin I and II. **Structure**, v.21, n.9, p.1602-1611, 2013.

BIGALKE, H.; RUMMEL, A. Botulinum Neurotoxins: Qualitative and Quantitative Analysis Using the Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). **Toxins**, v.7, n.12, p.4895–4905, 2015.

BOSSU, Carla Maíra. **Produção e caracterização de material de referência de forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos**. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BOWMER, E. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* Types A, B, C, D and E Antitoxins. **Bulletin of the World Health Organization**, v.29, n.6, p.701–709, 1963.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.23, de 18 de março de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Produção, Controle e Emprego de Vacinas Contra o Botulismo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 mar. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 49, 12 de Maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico, em anexo, elaborado pelo Departamento de Defesa Animal, a ser observado na produção, no controle e no emprego das vacinas de uso veterinário contra o carbúnculo sintomático, a gangrena gasosa, a enterotoxemia e o tétano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mai. 1997.

BYRNE, M. P.; SMITH, L. A. **Development of vaccines for prevention of botulism**. *Biochimie*, v.82, p.955-966, 2000.

CARDELLA, M. A. *et al.* Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid. **Journal of Bacteriology**, v.75, n.3, p.360-365, 1958.

CARDELLA, M. A. *et al.* Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* VI. Purification and detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid. **Journal of Bacteriology**, v.79, p.372-378, 1960.

CARDOSO, Maria Helena Wohlers Morelli. **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**. 2008. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

CASTLE, P. Reference standards for vaccine producing laboratories. **Revue Scientifique et Technique. (International Office of Epizootics)**, v.17, n.2, p.585-591, 1998.

CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. **Botulism**. Jun, 2010. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2019.

- CUNHA, C.E.P. *et al.* Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. **Vaccine**, v.32, p.214–216, 2014.
- DANILOVA, N.; AMEMIYA, C. T. Going Adaptive: The Saga of Antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*,v.1168, p.130-155, 2009.
- DE JONGH, K. S.; SCHWARTZKOFF, C. L.; HOWDEN, M. E. *Clostridium botulinum* type D neurotoxin: purification and detection. **Toxicon**, v.27, n.2, p.221-228, 1989.
- DOVER, N. *et al.* Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. **The Journal of Infectious Disease**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 192-202, 2014.
- DOXEY, A. C. *et al.* Insights into the evolutionary origins of clostridial neurotoxins from analysis of the *Clostridium botulinum* strain A neurotoxin gene cluster. **BMC evolutionary biology**, v. 316, n. 8, p. 1-9, 2008.
- DUTRA, I.S. *et al.* Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.2, p.43-48, 2001.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.2, p.115-119, 2005.
- EURACHEM/CITAC Guide. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3. ed., 2012.
- FEARN, T.; THOMPSON, M.. A new test for sufficient homogeneity. **Analyst**, v.126, p. 1414-1417, 2001.
- FUJINAGA, Y. *et al.* Molecular construction of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and its gene organization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.205, p.1291–1298, 1994.
- GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1221, p. 57-70, Jan. 2012.
- GASSMANN, M. *et al.* Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.4, n.1, p.2528-2532, 1990.
- GERDING D. N. *et al.*, *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. **Gut Microbes**, v.5, n.1, p.15-27, 2014.
- GESSLER, F.; BÖHNEL, H. Production and purification of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxin. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, p.361-367, 1999.
- GESSLER, F.; HAMPE, K.; BÖHNEL, H. Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an immunoaffinity chromatographic column test. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.7897–7903, 2005.

GIL, L. A. F. *et al.* Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D. **Plos One**, v.8, n.7, 2013.

GIMENEZ D. F.; GIMENEZ, J. A. The typing of botulinal neurotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, n.1, p. 1-9, 1995.

GONÇALVES, L. A. *et al.* Selection of a *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. **Archives of Microbiology**, v.191, p.847-851, 2009.

GUIZELINI, C. C. *et al.* Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage. **Anaerobe**, v.55, p.103-106, 2019.

GYLES, C.L.; THOEN, C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2.ed. Ames: Iowa State University, 1993. 331p.

HANSBAUER, E. M. *et al.* (2016). Detection, differentiation, and identification of botulinum neurotoxin serotypes C, CD, D, and DC by highly specific immunoassays and mass spectrometry. **Analyst**, v.23, 2016.

HAUSER, D. *et al.* Nucleotide sequence of *Clostridium botulinum* C1 neurotoxin. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.16, p.4924, 1990.

HILL, B. J. *et al.* Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. **BMC Microbiology**, v.10, n. 267, p. 1-16, Oct. 2010.

HILL, K. K. *et al.* Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.3, p.818-832, 2007.

HILL, K. K. *et al.* Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins. **Toxicon**, v.107, p.2-8, 2015.

HILL, K. K. *et al.* Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* types A, B, E and F and *Clostridium butyricum* type E strains. **BMC Biology**, v.7, n.66, p.1-18, 2009.

HILL, K. K.; SMITH T. J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.364, p.1–20, 2013.

HINES, Harry B. *et al.* Characterization of botulinum progenitor toxins by mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.8, p.4478-4486, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário Internacional de Metrologia**: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ, 2012. 94p.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 3951-4**. Sampling procedures for inspection by variables- Part 4: Procedures for assessment of declared quality levels. 2011.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO Guide 35**. Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. 2017.

JANNING, B. *et al.*, Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.352, n.1-2, p.240-245, 1995.

JCGM. **Avaliação de dados de medição — Guia para a expressão de incerteza de medição**. 1ª. edição brasileira, 2008. 126 p.

JERNE, N. K.; PERRY, W. L. M. The stability of biological standards. **Bulletin of the World Health Organization**, v.14, n.1. 1956; 14(1): 167–182.

JOHNSON, J. L.; FRANCIS, B. S. Taxonomy of the Clostridia: Ribosomal Ribonucleic Acid Homologies among the Species. **Journal of General Microbiology**, v.88, p.229-244, 1975.

JONES, R. G. A.; CORBEL, M. J.; SESARDIC, D. A review of WHO International Standards for botulinum antitoxins. **Biologicals**, v.34, p.223-226, 2006.

JORGE, Edson Vander. **Ampliação de escala da produção de toxinas botulínicas tipos C e D para a fabricação de vacinas veterinárias**. Orientador: José Geraldo da Cruz Pradella. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo – USP, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2003.

KALB, S. R. *et al.* Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples. **Toxins**, v.7, p.1765-1778, 2015.

KALB, S. R. *et al.* *Clostridium botulinum* strain Af84 produces three enzymatically active neurotoxins: BoNT/A2, BoNT/F4, and BoNT/F5. **Analytical Chemistry**, v.86, n.7, p.3254–3262, 2014.

KARALEWITZ, A. P-A. *et al.* Identification of a Unique Ganglioside Binding Loop within Botulinum Neurotoxins C and D-SA. **Biochemistry**, v.49, n.37, p.8117–8126, 2010.

KARALEWITZ, A. P-A.; BARBIERI, J. T. Vaccines against botulism. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.317–324, 2012.

KIMURA K. *et al.* The complete nucleotide sequence of the gene coding for botulinum type C1 toxin in the C-ST phage genome. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.171, n.3, p.1304-11, 1990.

KOUGUCHI H. *et al.* Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, n.3, p.416-423, 2006.

LANAGRO-MG. Laboratório de Produção de Materiais de Referência. **POP/PMR/PL/010 V.2** – Precipitação de imunoglobulinas com sulfato de amônio e purificação. 2015.

LANAGRO-MG. Laboratório de Produção de Materiais de Referência. **POP/PMR/PL/008 V.1** – Produção de toxina botulínica. 2014a.

- LANAGRO-MG. Laboratório de Produção de Materiais de Referência. **POP/PMR/PL/012** V.2 – Ambiente e Segurança. 2014b.
- LANAGRO-MG. Laboratório de Produção de Materiais de Referência. **POP/PMR/PL/021** V.1 – Produção de toxóide inativado pelo formol. 2012a.
- LANAGRO-MG. Laboratório de Produção de Materiais de Referência. **POP/PMR/PL/022** V.1 – Inoculação e sangria de animais para produção de antitoxinas clostridiais. 2012b.
- LI T. *et al.* The Effect of pH on Growth of *Clostridium botulinum* Type A and Expression of bontA and botR During Different Growth Stages. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.8, p.692-697, 2013.
- LINDBERG A. *et al.* Real-time PCR for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence--application on outbreaks of botulism in poultry. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.1-2, p.118-123, 2010.
- LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. Laboratory diagnostics of botulism. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.298-314, 2006.
- LINSINGER, T. P. J. *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 20-25, 2001.
- LOBATO F.C.F *et al.* Clostridioses dos animais de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.29-48, 2013.
- LOBATO, F. C. F. *et al.* Botulismo tipo C em ganso ocorrido em Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1179-1180, 2008.
- LOBATO, F. C. F. *et al.* Potência de toxóides botulínicos bivalentes C e D produzidos e comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.1, p.35-38, 1998.
- LOBATO, F. C. F. *et al.* Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. **Vaccine**, v.28, p.6125-6127, 2010.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.102, n.561-562, p.23-34, 2007.
- M. STERNE, M.; WENTZEL, L. M. A new method for the large-scale production of high-titre botulinum formol-toxoid types C and D. **Journal of Immunology**, v.65, p. 175-183, 1950.
- MACDONALD, T. E. *et al.* Analysis of *Clostridium botulinum* serotype E strains by using multilocus sequence typing, amplified fragment length polymorphism, variable-number tandem-repeat analysis, and botulinum neurotoxin gene sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 24, p.8625-8634, 2011.
- MANSFIELD, M. J.; ADAMS, J. B.; DOXEY, A. C. Botulinum neurotoxin homologs in non-*Clostridium* species. **FEBS Letters**, v.589, n.3, p.342-348, 2015.

- MASLANKA, S. E. *et al.* A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.213, n.3, p.379-385, 2016.
- MATTOO, L. D.; KELLER, J. E. New equine antitoxins to botulinum neurotoxins serotypes A and B. **Biologicals**, v.40, n.4, p.240-246, 2012.
- MILLER, W. J.; CAPY, P.. Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution. **Methods in Molecular Biology**, v. 206, p. 1-20, 2004.
- MIYASHITA, S-I. *et al.* Non-toxic proteins of the botulinum toxin complex exert in-vivo toxicity. **Scientific Reports**, v.6, n.31043, p.1-9, 2016.
- MIYATA, K. *et al.* Hemagglutinin gene shuffling among *Clostridium botulinum* serotypes C and D yields distinct sugar recognition of the botulinum toxin complex. **Pathogens and Disease**, v.73, n.7. p.1-9, 2015.
- MIYAZAKI, S.; IWASAKI, M.; SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* type D toxin: purification, molecular structure, and some immunological properties. **Infection and Immunity**, v.17, n.2, p.395-401, 1977.
- MONTECUCCO, C.; RASOTTO, M. B. On botulinum neurotoxin variability. **mBio**, v.6, n.1, p.1-6, 2015.
- MOZZER, Otto. **Cultivo em alta densidade do Clostridium botulinum tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias**. Orientador: Maria Candida Reginato Facciotti. 2004. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo – USP, Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, Butantan, São Paulo, 2004.
- MOREIRA JÚNIOR, C. *et al.*, 2016. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, v.40, p.58-62, 2016.
- MOREIRA, G. *et al.* Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. **Anaerobe**, v. 28, p.130-136, 2014.
- MORIISHI, K. *et al.* Molecular cloning of the gene encoding the mosaic neurotoxin, composed of parts of botulinum neurotoxin types C1 and D, and PCR detection of this gene from *Clostridium botulinum* type C organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 662-667, 1996b.
- MORIISHI, K. *et al.* Molecular Diversity of Neurotoxins from *Clostridium botulinum* Type D Strains. **Infection and immunity**, v.57, n.9, p. 2886-2891, 1989.
- MORIISHI, K. *et al.* Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.7, n.1307, p.123-126, 1996a.

MOURA, Edson de Souza. **Desenvolvimento de vacina contra botulismo tipo D utilizando como adjuvantes micropartículas e hidrogel de quitosana.** Orientador: Armando Cunha Júnior. 2011. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2011.

MÚRTULA R. *et al.* Development of a new reference material for the validation of molecular detection methods for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v.15, p. 217-221, 2010.

NAKAJIMA H. *et al.* Molecular composition of the 16S toxin produced by a *Clostridium botulinum* type D strain, 1873. **Microbiology and Immunology**, v.42, n.9, p. 599-605, 1998.

NAKAMURA, K. *et al.* Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.1-2, p.147-154, 2010.

NAKAMURA, K. *et al.* Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins. **Veterinary Microbiology**, v.162, n.2-4, p.881-890, 2013.

NAKAMURA, K. *et al.* Unique Biological Activity of Botulinum D/C Mosaic Neurotoxin in Murine Species. **Infection and Immunity**, v.80, n.8, p. 2886–2893, 2012.

NOWOTNY, A. Protein Determination by the Biuret Method. In: **Basic Exercises in Immunochemistry**, Heidelberg, Berlin: Springer, 1979. p.168-169.

OCHANDA, J. O. *et al.* Comparison of antigenicity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.1319-1322, 1984.

OGUMA K. *et al.* Analysis of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v.43, n.2, p.584- 588, 1984.

OGUMA K. *et al.* Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxic derivatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.2, p.256-260, 1986.

OGUMA, K. *et al.* Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Infection and Immunity**, v.30, p.656-660, 1980.

OGUMA, K. The stability of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D. **Journal of General Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 67-75, 1976.

OHYAMA, T. *et al.* Characterization of nontoxic-nonhemagglutinin component of two types of progenitor toxin (M and L) produced by *Clostridium botulinum* type D CB-16. **Microbiology and Immunology**, v.39, p.457–465, 1995.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. *et al.* Botulism in non-ruminants in Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.12, p.2158-2165, 2016.

ONDERSTEPOORT Vaccine Factory – Quality Assurance Department. **Standardisation of freeze-dried *Clostridium botulinum* type C or D Laboratory Test Toxins**. Pretoria, [199?].

OTAKA, D. Y. et al. Humoral Response of Buffaloes to a Recombinant Vaccine against Botulism Serotypes C and D. **Toxins**, v.9, n.10, 2017.

PAGE, M.; THORPE, R. Purification of IgG by Precipitation with Sodium Sulfate or Ammonium Sulfate. In: John M. Walker. **The Protein Protocols Handbook**. Hatfield, Reino Unido: Humana Press, 2002. p.983-984.

PECK, M. W. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. **Advances in Microbial Physiology**, v.55, n.183, p.265-320, 2009.

PECK, M.W. et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. **Toxins**, v.9, n.38, 2017.

PELLETT, S. et al. Purification and Characterization of Botulinum Neurotoxin FA from a Genetically Modified *Clostridium botulinum* Strain. **mSphere**, v.1, n.1, 2016.

PELLETT, S. Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.364, p.257-285, 2013.

PENG L. et al. Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins. **Journal of Cell Science**, v.125, n.13, p.3233–3242, 2012.

PEREIRA, F. L. et al. Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31. **Gut Pathogens**, v.8, n.11, 2016.

PHILIPP, W. J. et al. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v.12, p.134–138, 2007.

PIRES, P.S. et al. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2337-2346, 2012.

POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. **Toxicon**, v.75, p.63-89, 2013.

PREVOT, V. et al. Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. **Zoonoses Public Health**, v.54, p.320–327, 2007.

ROSSETTO O. et al. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **Journal of Neurochemistry**, v.97, n.6, p.1534-1545, 2006.

ROSSETTO O.; PIRAZZINI, M.; MONTECUCCO, C. Botulinum neurotoxins: Genetic, structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v.12, n.8, p.535-549, 2014.

SAKAGUCHI, Y. *et al.* Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. **Research in Microbiology**, v.166, n.4, p.318-325, 2015.

SALVARANI, F. M. *et al.* In vitro evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.78-783, 2010.

SARI, Roger Shoji. **Desenvolvimento de vacina de liberação controlada contra *C. botulinum* tipo c e tipo d utilizando quitosana**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Montes Claros, 2011.

SASAKI, Y. *et al.* Phylogenetic positions of *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* based on 16S rDNA sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.3, p.901-904, 2001.

SEBAIHIA, M. *et al.* Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. **Genome Research**, v.17, n.7, p.1082-1092, 2007.

SHARMA, S. K.; RAMZAN, M. A; SINGH, B. R. Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. **Toxicon**, v.41, n.3, p.321-331, 2003.

SILAS, J. C. *et al.* Selective and Differential Medium for Detecting *Clostridium botulinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.4, p.1110-1111, 1985.

SILVA, R. O. S. *et al.* Botulism in ruminants in Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.8, p.1411-1417, 2016.

SINGH, A. K.; STANKER, L. H.; SHARMA, S. K. Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies? **Critical Reviews in Microbiology**, v.39, n.1, p.43-56, 2013.

SKARIN, H. *et al.* *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. **BMC Genomics**, v.12, n.185, p.1-13, 2011.

SKARIN, H.; SEGERMAN, B. Horizontal gene transfer of toxin genes in *Clostridium botulinum*: Involvement of mobile elements and plasmids. **Mobile Genetics Elements**, v.1, n.3, p.213-215, 2011.

SKARIN, Hanna. **Genomic organization and diversity of *Clostridium botulinum* group III: The bug behind animal botulism**. 2015. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2015.

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine**, v. 27, n.4, p.D33–D39, 2009.

SMITH, T. J. *et al.* Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. **Infection, Genetics and Evolution**, v.30, p.102-113, 2015.

SOLOMON, H. M.; LILLY Jr., T. *Clostridium botulinum*. In: UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed., Revision A, 1998. Cap.17. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>. Acesso em: 11 jan 2019.

SOUZA, A. M. *et al.* Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.266-276, 2010.

SOUZA JÚNIOR, M. F. *et al.* Padronização da titulação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em linhagem contínua de células como alternativa ao bioensaio animal. **Ciência Rural**, v.40, p.600-603, 2010.

STEINMAN, A. *et al.* Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.8, p.862-868, 2006.

STILES, B. G. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? **Toxins**, v.5, n.11, p.2138-2160, 2013.

STROTMEIER, J. *et al.* The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites. **Molecular Microbiology**, v.81, n.1, p.143-156, 2011.

SUNAGAWA, H. *et al.* The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type D neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding phage d-16 phi genome. **The Journal of veterinary medical science**, v.54, n.5, p.905-913, 1992.

SUNDEEN G., BARBIERI, J. T. **Vaccines against Botulism**. *Toxins*, v.9, n.268, 12 p, 2017.

TAKEDA, M. *et al.* Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. **Avian Diseases**, v.49, n.3, p.376-381, 2005.

TAKESHI, K. *et al.* Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. **Microbiology and Immunology**, v.40, n.1, p.5-11, 1996.

TAMURA, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.2725-2729, 2013.

TANG, X.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.2, p.191-200, 2004.

TAPPIN, Marcelo Raul Romero. **Proposta de protocolo para a certificação de material de referência para derivados de plantas medicinais**. 2012. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

TERAJIMA, J. *et al.* Purification and characterization of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type C 6813. **Infection and immunity**, v.48, n.2, p.312-317, 1985.

THIRUNAVUKKARASU, N. *et al.* Botulinum neurotoxina detection methods for public health response and surveillance. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v.6, article 80, 2018.

TOKARNIA, C. H. *et al.* Botulismo Em Bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.465-472, 1970.

TSUKAMOTO, K. *et al.* Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. **The Journal of biological chemistry**, v.280, n.42, p.35164-35171, 2005.

ULRICH, João Cristiano. **Preparação e caracterização de um material de referência de peixe**. 2011. 114 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2011.

VAN DER VEEN, A. M. H. *et al.* Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 4. Characterisation and certification. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.290-294, 2001(b).

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.26-30, 2001(a).

WEBB R. P. *et al.* Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v.25, n.21, p.4273-4282, 2007.

WEBB, R. P.; SMITH, L. A. What next for botulism vaccine development? **Expert Review of Vaccines**, v.12, n.5, p. 481-492, 2013.

WENZEL, L. M., STERNE, M., POLSON, A. High toxicity of pure botulinum type D toxin. **Nature**. V.166, n.4226, p.739-740, 1950.

WIEGERS, W. *et al.*, 1991 Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by *Clostridium botulinum* C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. **European Journal of Cell Biology**, v.54, n.2, p.237-245, 1991.

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

WORBS, S. *et al.* Qualitative and Quantitative Detection of Botulinum Neurotoxins from Complex Matrices: Results of the First International Proficiency Test. **Toxins**, v.7, p.4935-4966, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. **Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines.** Geneva: WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Expert Committee on Biological Standardization. **WHO Technical Report Series n.293**, 17th Report. Geneva: WHO, 1964.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Expert Committee on Biological Standardization. **WHO Technical Report Series n.786**, 39th Report. Geneva: WHO, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Expert Committee on Biological Standardization. **WHO Technical Report Series n.932**, 55th Report. Annex 2 Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). Geneva: WHO, 2006.

WOUNDSTRA, C. *et al.* Draft genome sequences of five brazilian *Clostridium botulinum* Group III type D/C strains. **Genome Announcements**, v.5, n.20, 2017.

WOUNDSTRA, C. *et al.* Investigation of *Clostridium botulinum* group III's mobilome content, **Anaerobe**, v. 49, p. 71-77, 2018.

WOUNDSTRA, C. *et al.* Molecular Gene Profiling of *Clostridium botulinum* Group III and Its Detection in Naturally Contaminated Samples Originating from Various European Countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.7, p.2495-2505, 2015.

WOUNDSTRA, C. *et al.* Neurotoxin Gene Profiling of *Clostridium botulinum* Types C and D Native to Different Countries within Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.9, p.3120–3127, 2012.

WOUNDSTRA, C. *et al.* New Insights into the Genetic Diversity of *Clostridium botulinum* Group III through Extensive Genome Exploration. **Frontiers in Microbiology**, v.7, Article 757, 2016.

YU, Y. Z. *et al.* (2010) Development and evaluation of candidate vaccine and antitoxin against botulinum neurotoxin serotype F. **Clinical Immunology**, v.137, n.2, p.271-280, 2010.

ZHANG, Z. *et al.* Plasmid-borne type E neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.12, p.3856-3859, 2013.

ZHANG, Z. *et al.* Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. **Nature Communications**, v.8, n.14130, 2017.

ZHOU, Y. *et al.* The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin are on a plasmid. **Infection and Immunity**, v.63, n.5, p.2087-2091, 1995.

ZUÑIGA, A. D. G. *et al.* Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim Ceppa**, v.21, n.1, p.61-82, 2003.

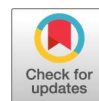
9. ANEXOS

ANEXO 1 – Artigos científicos publicados

ANEXO 2 – Resultados individuais e cálculos estatísticos dos estudos de homogeneidade e estabilidade das toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

ANEXO 3 – Modelos de Certificados para MRCs de estirpes de *Clostridium botulinum*, toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

ANEXO 1: Artigos científicos publicados



Draft Genome Sequences of Five Brazilian *Clostridium botulinum* Group III Type D/C Strains

Cédric Woudstra,^a Roseane B. Brito,^b Antônio A. Fonseca Júnior,^b
Rodrigo O. S. Silva,^c Francisco C. F. Lobato,^c Patrick Fach^a

ANSES, Food Safety Laboratory, Platform IdentityPath, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France^a; Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), National Agricultural Laboratory (LANAGRO/MG), Minas Gerais, Brazil^b; Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil^c

ABSTRACT Animal botulism is mainly associated with *Clostridium botulinum* group III-producing neurotoxin types C, C/D, D, and D/C. In this report, we present the draft genome sequences of the first five strains of *Clostridium botulinum* type D/C isolated in Brazil and used for vaccination purposes.

Animal botulism is caused by group III *Clostridium botulinum* strains that produce type C and D toxins, or a chimeric fusion of C and D termed C/D or D/C toxins (1). Animal botulism is considered an emerging disease in Europe, notably in poultry production (2), where it could lead to significant economic losses (3). It has been shown previously that animal botulism in Europe is mainly due to mosaic type C/D strains for avian species and type D/C strains for bovines (4). In Brazil, the disease is endemic in avian species and in domestic ruminants (5, 6), but the type of botulism is clouded by the absence of molecular studies with isolated strains.

Currently, the genome sequences of *Clostridium botulinum* group III strains available in the public database are limited to 2 type C, 21 type C/D, 3 type D, and 5 type D/C strains. They originate from different countries, but none originate from South America.

In order to investigate the epidemiological genetic relationship of strains originating from different geographical areas, we sequenced the genomes of five strains of *Clostridium botulinum* group III type D/C. They all originated from Brazil.

Genomic DNA was extracted from a 48-h culture, incubated at 37°C under anaerobic conditions in tryptone-peptone-glucose-yeast extract (TPGY) medium, using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria. Libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina). Whole-genome sequencing was performed using an Illumina MiSeq platform (Illumina), according to the manufacturer's instructions. Five MiSeq runs were carried out, three with paired-end 150-nucleotide (nt) reads on MiSeq version 2 nano, one with version 2 micro, and the last with version 2 standard chemistry. The raw reads were trimmed (minimum length, 35 bp; quality score, 0.03) and assembled in CLC Genomics Workbench 8.0.2 by *de novo* assembly (minimum contig length, 1,000 bp), producing 105 to 190 contigs (Table 1). The median read depth of the assemblies ranged from 30× for isolates 1275 and 1276 to 450× for isolate 1274, with N_{50} values between 34 kbp and 47 kbp (Table 1). The sequences were annotated with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) (7).

The average size of the genomes in this study is 2.94 Mb, with 2.57 Mb being the smallest genome size, an average G+C content of 28.1% (isolate 1277, Table 1), and 2.94 Mb as the largest genome size (isolate 1274, Table 1). On average, 2,554 coding sequences were identified in the genomes (Table 1). A preliminary phylogenetic

Received 22 March 2017 Accepted 27 March 2017
Published 18 May 2017

Citation Woudstra C, Brito RB, Fonseca Júnior AA, Silva ROS, Lobato FCF, Fach P. 2017. Draft genome sequences of five Brazilian *Clostridium botulinum* group III type D/C strains. *Genome Announc* 5:e00349-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00349-17>.

Copyright © 2017 Woudstra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Patrick Fach, patrick.fach@anses.fr.

TABLE 1 NCBI accession numbers and assembly metrics of *Clostridium botulinum* group III draft genome sequences

Isolate	Origin	<i>bont</i> type	No. of contigs	Genome size (Mbp)	G+C (%)	N_{50} (kbp)	Median read depth (×)	No. of coding sequences (per PGAAP)	NCBI accession no.	SRA accession no.
1274	Vaccine	D/C	122	2.94	28.0	43.278	450	2,648	MVIY00000000	SRR5239628
1275	Vaccine	D/C	131	2.94	27.9	40.516	30	2,642	MVIZ00000000	SRR5239627
1276	Vaccine	D/C	127	2.91	27.9	47.330	30	2,634	MVJA00000000	SRR5239626
1277	Vaccine	D/C	105	2.57	28.1	40.321	50	2,311	MVJB00000000	SRR5239625
CP05	Vaccine	D/C	190	2.88	28.0	34.348	200	2,537	MVJC00000000	SRR5239624

analysis showed the sequences to be related to group Ib of the *C. botulinum* group III genomes, as defined previously (8). A detailed report on further analyses of the draft genome sequences will be released in a future publication.

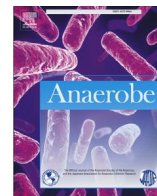
Accession number(s). The annotated draft whole-genome sequences of these *Clostridium botulinum* group III strains were deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accession numbers listed in Table 1. The versions described in this paper are the first versions.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was made possible by financial support from the French Ministry of Agriculture and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; it was supported by the ANIBOTNET project (funded by the Animal Health and Welfare ERA-Net).

REFERENCES

1. Takeda M, Tsukamoto K, Kohda T, Matsui M, Mukamoto M, Kozaki S. 2005. Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian Dis* 49:376–381. <https://doi.org/10.1637/7347-022305R1.1>.
2. Souillard R, Woudstra C, Le Maréchal C, Dia M, Bayon-Auboyer MH, Chemaly M, Fach P, Le Bouquin S. 2014. Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Avian Pathol* 43:458–464. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.957644>.
3. Lindberg A, Skarin H, Knutsson R, Blomqvist G, Båverud V. 2010. Real-time PCR for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence-application on outbreaks of botulism in poultry. *Vet Microbiol* 146:118–123. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.030>.
4. Woudstra C, Skarin H, Anniballi F, Fenicia L, Bano L, Drigo I, Koene M, Bâyon-Auboyer MH, Buffereau JP, De Medici D, Fach P. 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78:3120–3127. <https://doi.org/10.1128/AEM.07568-11>.
5. Silva ROS, Oliveira Junior CA, Goncalves LA, Lobato FCF. 2016. Botulism in ruminants in Brazil, p. 1411–1417. *Ciencia Rural* vol. 46, no. 8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151486>.
6. Oliveira Junior CA, Silva ROS, Olinda RG, Lobato FCF. 2016. Botulism in non-ruminants in Brazil, p. 2158–2165. *Ciencia Rural* vol. 46, no. 12. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160394>.
7. Angiuoli SV, Gussman A, Klimke W, Cochrane G, Field D, Garrity G, Kodira CD, Kyrpides N, Madupu R, Markowitz V, Tatusova T, Thomson N, White O. 2008. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS* 12:137–141. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0017>.
8. Skarin H, Segerman B. 2014. Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens. *PLoS One* 9:e107777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107777>.



Molecular biology and genetics of anaerobes

Investigation of *Clostridium botulinum* group III's mobilome content

Cédric Woudstra^a, Caroline Le Maréchal^{k, l}, Rozenn Souillard^{b, k}, Fabrizio Anniballi^c,
Bruna Auricchio^c, Luca Bano^d, Marie-Hélène Bayon-Auboyer^e, Miriam Koene^f,
Isabelle Mermoud^g, Roseane B. Brito^h, Francisco C.F. Lobatoⁱ, Rodrigo O.S. Silva^j,
Martin B. Dorner^k, Patrick Fach^{a, *}

^a Université Paris-Est, Anses, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France

^b ANSES, French Agency for Food Environmental and Occupational Health Safety, Avian and Rabbit Epidemiology and Welfare Unit, University of Bretagne Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

^c Istituto Superiore di Sanità (ISS) Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, National Reference Centre for Botulism, Rome, Italy

^d Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Laboratorio di Treviso, Italy

^e LABOCEA, Ploufragan, France

^f Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad, The Netherlands

^g LNC, Veterinary Diagnostic Laboratory, Païta, New Caledonia

^h Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), National Agricultural Laboratory (LANAGRO/MG), Brazil

ⁱ Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

^j Robert Koch-Institut (RKI) Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Biological Toxins, Consultant Laboratory for Neurotoxin-producing Clostridia (botulism, tetanus), Berlin, Germany

^k ANSES, French Agency for Food Environmental and Occupational Health Safety, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, University of Bretagne Loire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

^l UBL, Brittany and Loire University, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2017

Received in revised form

19 December 2017

Accepted 21 December 2017

Available online 26 December 2017

Handling Editor: Francisco Uzal

Keywords:

Animal botulism

Clostridium botulinum group III

Plasmid

Phage

ABSTRACT

Clostridium botulinum group III is mainly responsible for botulism in animals. It could lead to high animal mortality rates and, therefore, represents a major environmental and economic concern. Strains of this group harbor the botulinum toxin locus on an unstable bacteriophage. Since the release of the first complete *C. botulinum* group III genome sequence (strain BKT015925), strains have been found to contain others mobile elements encoding for toxin components. In this study, seven assays targeting toxin genes present on the genetic mobile elements of *C. botulinum* group III were developed with the objective to better characterize *C. botulinum* group III strains. The investigation of 110 *C. botulinum* group III strains and 519 naturally contaminated samples collected during botulism outbreaks in Europe showed alpha-toxin and C2-I/C2-II markers to be systematically associated with type C/D *bont*-positive samples, which may indicate an important role of these elements in the pathogenicity mechanisms. On the contrary, *bont* type D/C strains and the related positive samples appeared to contain almost none of the markers tested. Interestingly, 31 *bont*-negative samples collected on farms after a botulism outbreak revealed to be positive for some of the genetic mobile elements tested. This suggests loss of the *bont* phage, either in farm environment after the outbreak or during laboratory handling.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Clostridium botulinum group III is the main organism responsible

for botulism in animals [1]. The accountable strains are capable of producing botulinum toxins (BoNTs) type C, D and their mosaic forms C/D or D/C, which are encoded by the respective *bont* genes carried by lysogenic phages [2]. One of the particularities of these phages is that they are present in an unstable lysogenic state, but easily lost during laboratory cultivation [3]. The factors involved in the phage's instability are unknown. *C. botulinum* group III detection and characterization are based either on the toxin's genetic locus or the toxin itself [4–6]. Investigation of multiple samples

* Corresponding author. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses), Food Safety Laboratory, Platform IdentityPath, 14, rue Pierre et Marie Curie Fr-94700 Maisons-Alfort cedex France.

E-mail address: patrick.fach@anses.fr (P. Fach).

(e.g. liver) [7] is recommended to increase the chance of detection. Previous work [8,9] has revealed that the mobilome of *C. botulinum* group III type C and C/D strains can contain different combinations of mobile genetic elements (MGE), designated p1 to p6, with p1 to p5 identified in reference strain BKT015925 and p6 in strain C-Stockholm. As such, these MGE could aid in differentiation between *C. botulinum* group III isolates implicated in different outbreaks [10]. Briefly, a strain or a sample presumptively positive for *C. botulinum* group III would systematically contain the unstable phage coding for BoNT (p1 in strain BKT015925), in association with p2 to p6. The p2 plasmid (100 kb) contains the genes coding for the alpha-toxin and clostripain virulence factors. Alternatively, the p3 plasmid (80 kb) harbors C2 toxin gene elements (C2-I and C2-II), the p4 is a prophage (40 kb), and the p5 plasmid (12 kb) encompasses Epsilon-like toxins. Further, the p6 found in the historical strain C-Stockholm is a prophage (55 kb) and contains the bacteriocin gene [8]. The reference strain, BKT015925 *bont* type C/D, contains p1 to p5, which together accounts for 13.5% of its total genomic content [8]. The mobilome of the *C. botulinum* group III which differentiates it from the closely related *C. novyi*, is considered the largest number of plasmids in any completed clostridia genome [9]. The objective of this study was to investigate the diversity of *C. botulinum* group III's mobilome. Therefore, seven new real-time PCR assays targeting specific genetic markers on p2 to p6 were developed and evaluated. These assays were tested on 110 *C. botulinum* group III strains and 519 DNA extracts originating from naturally contaminated samples.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The panel of investigated *C. botulinum* group III strains ($n = 110$) composed of 19 *C. botulinum* type C, 59 mosaic type C/D, 5 type D, and 27 mosaic type D/C strains. In addition, a total of 91 *Clostridium* strains of groups I, II, and IV producing other BoNT serotypes (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E, BoNT/F and BoNT/G) were tested as negative controls. Forty-eight non-BoNT producing strains of other *Clostridium* species were used as negative controls: *C. butyricum*, *C. baratii*, *C. beijerinckii*, *C. bifementans*, *C. chauvoei*, *C. difficile*, *C. mangenotii*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. oedematiens*, *C. perfringens* types A, C, D, and E, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. spirogenes*, *C. sporogenes*, *C. subterminale*, and *C. tetani*. Forty eight strains of other bacterial species were also analysed as non-*Clostridium* negative controls: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica* serovar (ser.) *Virchow*, *S. enterica* ser. *Hadar*, *S. enterica* ser. *Enteritidis*, *S. enterica* ser. *Infantis*, *S. enterica* ser. *Typhimurium*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, and *Yersinia enterocolitica*. All strains were grown as previously described [11].

2.2. Naturally contaminated samples

As group III of *C. botulinum* is difficult to isolate, the assays developed here were directly evaluated on supposedly naturally contaminated samples. A total of 519 clinical (intestinal contents and organs) and environmental (insects, droppings, feces, feed, litter, manure, soil, farm swabs, udder, and water) samples of various origins (bovine, chicken, duck, goose, guinea fowl, mink, poultry, and turkey), collected during animal botulism outbreaks reported between 2006 and 2014 (mainly across Europe), were investigated. Each sample (1 g) was 10-fold diluted (wt/vol) in pre-reduced TPGY medium produced at the laboratory and incubated for four days at 37 °C in anaerobic conditions. After incubation, a

1 ml aliquot of the enrichment broth was collected and centrifuged at 9000 × g for 5 min. The supernatant was discarded, and the cell pellet was subjected to DNA extraction. DNA of the tested strains and samples were extracted as previously described [11]. The aforementioned DNA samples were previously tested by PCR for their *bont* genes and checked for the absence of PCR inhibitors [11].

2.3. Genomic DNA isolation

DNA was extracted using one of the following protocols: Phenol/Chloroform extraction [12], DNeasy blood and tissue kit, Qiamp DNA mini kit (both Qiagen, Hilden, Germany) or Chelex 100 (Bio-Rad Life Science Research, Hercules, CA) according to manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria. DNA samples were stored at -20 °C until high throughput real-time PCR analysis.

2.4. Primers and probes

The primers and probes used in the present study are listed in Table 1. They were designed using the Beacon Designer Software (version 7.91) and purchased from Eurofins MWG Operon (Courtaboeuf, France). The assays target the alpha-toxin gene on plasmid p2, the toxin gene components C2-I and C2-II on plasmid p3, the hypothetical protein gene Cbc4_7002 on prophage p4, the epsilon-like toxin gene components I and II on plasmid p5 and the bacteriocin gene on prophage p6 (respective p1 to p6 accession numbers NC_015426, NC_015418, NC_015427, NC_015419, CM003370). The specificity of the oligonucleotides for gene-specific identification was checked by *in silico* analysis against the published sequences from the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

2.5. High throughput real-time PCR

The LightCycler® 1536 (Roche, Meylan, France) was used to perform high throughput real-time PCR amplifications as previously described [13]. Briefly the PCR reaction was performed in a 2 µl final volume. Primers and TaqMan® probes (FAM labeled) were used at a final concentration of 300 nM for the PCR reaction. The following thermal profile was used: 95 °C for 2 min followed by 40 cycles of 95 °C for 1 s and 55 °C for 30 s [13].

3. Results

3.1. *C. botulinum* group III mobilome assays limit of detection and specificity

The limit of detection of each assay was assessed using the reference strain 468 (*bont* type C) and strain 48212 (*bont* type C/D), both together containing p2 to p6 MGEs. The PCR assays showed limits of detection up to 6 to 7 genome equivalents/PCR tube, with R² values from 0,9908 to 0,9988 (see Supplementary Table S1 online). Evaluating the specificity of the assays *in silico* showed them to be specific. All assays were evaluated for their specificity also *in vitro* on 91 non-*C. botulinum* group III strains (consisting of *bont* types A, B, E, F, and G), 48 non-*C. botulinum* clostridia, and 48 non-*Clostridium* bacteria and tested negative.

3.2. Plasmidome of *C. botulinum* group III strains

110 genomic DNA extracted from strains of *C. botulinum* group III showed different profiles depending on the presence or absence of the investigated genetic markers (Table 2). *Bont* type C strains contained p3 only or p3 and p6. *Bont* type D strains contained p3 only, p2 and p3 or none. All *bont* type C/D strains showed to contain

Table 1
Primers and probes.

Primer or probe ^a	Sequence 5' → 3' ^b	Amplicon size (bp)
p2_alphatox_F p2_alphatox_R p2_alphatox_P	GCACTTTGTACATCACTTATAGC CTGGTATTTTGTAAATTCCTACTAGC ACCTTATACTACAGCCCTTGCTTCTAC	103
p3_C2-I_F p3_C2-I_R p3_C2-I_P	CTGCATTCAGATTATAAAGCTA AGAGCAGAACCTTATTAATTCAG AAGCTCGTCATTATTTGGAACCTATT	101
p3_C2-II_F p3_C2-II_R p3_C2-II_P	TGCTCCAGTGATAAATGTTA GTTCCACCAGGATTTAGATA ACAATCTGTAGCCACTATTAAGGGACA	114
p4_HypTox_F p4_HypTox_R p4_HypTox_P	AAGGGTTTTATTTCCAAACA CAGCAACAACAGAATTTAG AATACCTCTAATTTAGAAGGGAACTTACA	75
p5_Epsilon-tox-I_F p5_Epsilon-tox-I_R p5_Epsilon-tox-I_P	GAGGAATTAGCCATCTAGC GGGATATGATTATATTGATTGTGG ACCACTACACAAGGATGACCACCTG	117
p5_Epsilon-tox-II_F p5_Epsilon-tox-II_R p5_Epsilon-tox-II_P	CTTCAAAGTTAAAATCACCAC ATGGGATTAAGGTAGGGTG TTCTACAGTTCCTCAACACCATTACC	110
p6_bacteriocin_F p6_bacteriocin_R p6_bacteriocin_P	GGTGAAGTTATAGATAATGATGC GCTCTAAGTAAAAGTTCATCTG AAATGCTTACCTAAATATCCATACGCTA	92

Target genes are here referred to as alphatox for the alpha toxin present on MGE p2, C2-I and C2-II for the C2 toxin dual components present on p3, huptox for a hypothetical toxin on p4, epsilonI and epsilonII for the dual toxin components of epsilon-like toxin on p5, and bacteriocin for the bacteriocin toxin present on p6.

^a F, forward (primer); R, reverse (primer); P, probe.

^b All probes were labeled with 6-FAM and BHQ1 (Black Hole Quencher).

Table 2
Clostridium botulinum group III mobilome assays.

<i>bont</i> type	Origin	nb of strains	p2	p3	p3	p4	p5	p5	p6
			alphatox	C2-I	C2-II	huptox	epsilonI	epsilonII	bacteriocin
C	Pasteur, Sweden, The Netherlands, Germany	13	–	+	+	–	–	–	+
C	Pasteur, Italy, Brazil	7	–	+	+	–	–	–	–
D	Africa	1	–	+	+	–	–	–	–
D	The Netherlands	3	+	+	+	–	–	–	–
C/D	Japan, The Netherlands, Italy, France, Germany	12	+	+	+	–	–	–	–
C/D	Sweden, The Netherlands	2	+	+	+	+	–	–	–
C/D	Sweden, France, Italy	14	+	+	+	+	+	+	–
C/D	Italy, France, The Netherlands, Germany	32	+	+	+	–	+	+	–
D/C	Pasteur	1	–	+	+	–	–	–	+
D/C	Italy	1	+	+	+	–	–	–	–
D/C	Pasteur, Italy, Japan, France, Brazil, The Netherlands, New Caledonia	21	–	–	–	–	–	–	–

(–) indicates a negative result, (+) indicates a positive result. P2 to p6 refer to the MGE genes target's location; the target genes are referred as alphatox for the alpha-toxin, C2-I and C2-II for the C2 toxin dual components, huptox for a hypothetical toxin, epsilonI and epsilonII for the dual toxin components of epsilon-like toxin, and bacteriocin for the bacteriocin toxin.

the genetic markers for plasmid p2 and p3, with 47 strains out of the 60 containing also p4, p5 and/or p6. Most of the *bont* type D/C strains were negative for p2 to p6 assays. Nonetheless, one type D/C strain was found to be positive for p2 and p3, and another strain for p3 and p6.

3.3. Screening of *C. botulinum* group III mobilome in naturally contaminated samples

Of the 519 genomic DNA extractions from enriched samples, 175 were *bont*-positive (144 for *bont* type C/D, 7 for both *bont* type C/D and D/C, and 24 for *bont* type D/C [see [Supplementary Table S1](#) online and [Fig. 1](#)]). Out of the *bont*-positive samples, almost exclusively *bont* type C/D samples contained the tested mobilome markers. The main MGE profiles detected were p2–p3 (32%), followed by profiles p2–p3–p5 and p2–p3–p4–p5 which each

represented 25% ([Table 3](#)). Markers for the alpha-toxin (p2) and for the C2-I and C2-II components (p3) were present simultaneously in 86% of the *bont*-positive samples, and 100% of the *bont* type C/D. p4 was present in 27%, p5 in 54%, while p6 represented only 3% of the *bont*-positive samples (see [Supplementary Table S1](#) online and [Fig. 1](#)). Type D/C positive samples were almost all negative for the mobilome genetic markers. Only one of the 24 *bont* type D/C samples was positive for p1–p2–p3–p4–p5 (see [Supplementary Table S1](#) online). Interestingly, out of the 344 *bont*-negative samples, 31 tested positive for a mixed content of p2 to p6 (see [Supplementary Table S1](#) online). All French *bont*-negative samples were environmental poultry farms samples after type C/D botulism outbreaks. Interestingly, the 31 *bont*-negative samples positive for parts of the mobilome were all positive for p2 and p3. The mobilome of *bont*-positive and -negative samples was compared among each outbreak ([Table 4](#)). *Bont*-positive samples collected in farm N°

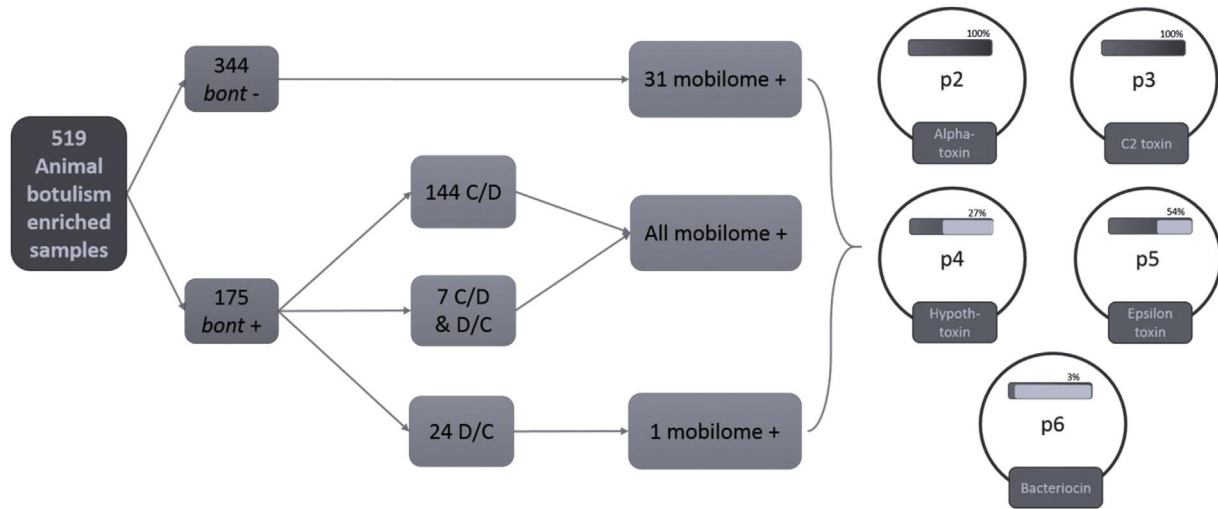


Fig. 1. Naturally contaminated samples mobilome content summary. Results summary of the 519 naturally contaminated samples tested for p2 to p6 MGE genetic markers. The presence of specific MGE profiles in *bont*-negative samples could indicate that these samples lost their *bont* phage p1. The systematic presence of markers p2 and p3 could indicate an important role in the pathogenicity mechanism.

Table 3
Characterization of naturally contaminated samples through their mobilome content.

Location	Species	Origin	p2 p3		p2 p3 p5		p2 p3 p4 p5		p2 p3 p5 p6		p2 p3 p4 p5 p6	
			<i>bont</i> +	<i>bont</i> -	<i>bont</i> +	<i>bont</i> -	<i>bont</i> +	<i>bont</i> -	<i>bont</i> +	<i>bont</i> -	<i>bont</i> +	<i>bont</i> -
France, Germany, Italy, New Caledonia, The Netherlands.	Bovine, chicken, coypu, duck, egret, feed, guinea fowl, gulls, pheasant, rat, soil, swan, turkey.	Environment swabs, feces, feed, insects, litter, organs, water.	57	4	45	6	44	13	3	2	3	6

519 enriched samples from animal botulism outbreaks around the world were tested for their MGE content. 175 were positive for the *bont* phage p1 and showed a particular mobilome content. 31 samples detected negative for the *bont* phage p1 also showed a mobilome content identical to *bont*-positive samples.

Table 4
Comparison of the mobile genetic element (MGE) profiles of French naturally contaminated samples presented both *bont*-positive and -negative samples.

Reference of the outbreak	Localization	Animal species	<i>bont</i> type	Number of samples	MGE profile
12LNR-5	France	Chicken	C/D	3	p2 p3 p4 p5 p6
			C/D	3	p2 p3 p5 p6
			C/D	1	p2 p3 p5
			Neg	1	p2 p3 p4 p5 p6
12LNR-10	France	Turkey	C/D	6	p2 p3 p4 p5
			Neg	2	p2 p3 p4 p5
12LNR-11	France	Chicken	C/D	5	p2 p3 p4 p5
			Neg	4	p2 p3 p4 p5
12LNR-12	France	Chicken	C/D	10	p2 p3 p4 p5
			Neg	4	p2 p3 p4 p5
			Neg	1	p2 p3 p4 p5 p6
12LNR-13	France	Laying Hens	C/D	12	p2 p3 p5
			Neg	2	p2 p3 p5
			Neg	2	p2 p3
12LNR-18	France	Turkey	C/D	1	p2 p3 p4 p5
			Neg	2	p2 p3 p4 p5
			Neg	2	p2 p3 p5 p6
			Neg	4	p2 p3 p4 p5 p6
13LNR-1	France	Turkey	C/D	15	p2 p3 p4 p5
			Neg	2	p2 p3 p4 p5

82 samples out of seven *bont*-positive French outbreaks showed characteristic MGE profiles, where 56 were *bont* type C/D while 26 were *bont*-negative.

12LNR5 showed three different MGE profiles (based on the presence or absence of prophage elements p4 and p6); while one sample was *bont*-negative, but showed a mobilome profile identical to three other *bont*-positive samples. This would suggest this *bont*-negative sample might have lost its p1 phage, while retaining the other MGEs. *Bont*-positive and negative samples collected from farms N° 12LNR-10, -11 and 13LNR-1 showed in each case the same MGE profile, which emphasizes the hypothesis about the loss of p1. *Bont*-positive and -negative samples collected from farms N° 12LNR-12, -13, and -18 showed both similar and different MGE profiles. Interestingly, samples from farm N° 12LNR-18 were collected six months after the botulism outbreak. This could explain why only one sample was *bont* C/D- and MGE-positive while the other samples were *bont*-negative and MGE-positive. All enriched samples positive for the MGE assays (both *bont*-positive or -negative) were positive for the presence of *C. novyi sensu lato* [13] (data not shown). This confirmed that the samples negative for the *bont* gene, but positive for the MGE, are indeed part of the *C. novyi sensu lato* pathotype.

4. Discussion

The presence of toxin genes in the MGE of type C/D *C. botulinum* strain BKT015925 [8], and the existence of up to 13 different groups of plasmids in *C. novyi sensu lato* [23] makes the mobilome a major contributor to the genetic diversity of *C. botulinum* group III. To the authors knowledge very little information is available regarding the accessory genome of *C. botulinum* group III [8,9]. Therefore, the objective of this study was to investigate the mobilome of *C. botulinum* group III.

4.1. *C. botulinum* type C and D mobilome

Only a small number of *C. botulinum* *bont* type C and D strains were tested in our study because of the infrequency of outbreaks involving these BoNT types during the last decade in Europe. The results showed that *bont* type C and D strains have a limited number of the MGE investigated here. Considering that the type C and D strains studied here are quite old, it cannot be excluded that these MGE (p2 – p6) were lost during storage. It could also be explained by the absence of the tested markers or by sequences discrepancies in the primer and probe binding regions tested herein. Alternatively, the absence of these plasmids in type C and D strains may also explain why they are not commonly isolated from animal botulism outbreaks [7,11,14,15], considering they could give an adaptive advantage. This should, however, be further investigated.

4.2. *C. botulinum* type C/D mobilome

Most avian botulism outbreaks in the last decade were caused by *C. botulinum* group III *bont* type C/D. The MGE profiles of this type within this study contained a specific combination of p2 to p6. All of the tested strains of *bont* type C/D contained p2 and p3 markers, with p4 to p6 present or absent in combination. Results obtained by the analysis of naturally contaminated samples confirmed the systematic presence of p2 and p3 in type C/D strains. This result would suggest that the alpha-toxin and toxin component C2-I/C2-II which are p2 and p3 markers, respectively, could play an important role in the pathogenicity mechanism of *C. botulinum* *bont* type C/D in animal botulism outbreaks. C2 toxin catalyzes ADP-ribosylation of actin, which leads to redistribution of the cytoskeleton and depolymerization of actin resulting in cells rounding [16]. The corresponding toxin of *C. difficile* (CDT) is also an important factor for the severity of *difficile*-associated diarrhoea

[17]. The alpha-toxin belongs to the aerolysin superfamily and shows similarity to the alpha-toxin of *C. septicum*, which has both necrotic and haemolytic properties [18]. Considering that BoNT type C/D is mostly involved in avian botulism outbreaks [11], the role of these toxins in a possible host-adaptation should also be explored [19].

Epsilon-like toxin markers located on p5 MGE were present in more than half of the *bont*-positive samples. This toxin belongs to the aerolysin-like toxin family and is in *C. perfringens* infections responsible for haemorrhagic enteritis [20]. It is possible that this toxin could also play a role in the pathogenicity mechanism of *C. botulinum* group III, which has not yet been investigated. Unfortunately, post mortem examination information was not available here. Such data could be of interest, as the usual diagnosis of botulism is based on the absence of post mortem damages.

Assays for p4 and p6 revealed that p4 was present in 27% of *bont* type C/D strains and 32% of *bont* type C/D naturally contaminated samples, while p6 was present in 63% of type C strains and in only six *bont* type C/D samples collected from one outbreak. Different hypotheses may address the lower prevalence of p4 and p6 compared to p2, p3 and p5. First, p4 and p6 are considered as real prophages [8]. They could therefore be more prone to activate their lytic cycle and then be more easily lost. This could explain the observed differences in comparison with p2, p3 and p5. Another hypothesis is that these MGE could play a less important role in pathogenesis and may not be essential for the bacteria. This should, however, be further explored.

Among the strains explored herein, p2 and p3 were well conserved among type C/D strains, while p4, p5 and p6 appeared to be less stable.

4.3. *C. botulinum* type D/C mobilome

Most of the strains and samples that tested positive for *bont* type D/C, tested negative for p2 to p6 elements. This could either be explained by the absence of the tested markers or by sequences discrepancies in the primer and probe binding regions tested here, which were designed based on sequences of *bont* type C/D strains. The presence of MGE p2 to p6 markers was not detected in the publicly available genome sequences of seven type D/C strains (data not shown). Previous work has demonstrated that BoNT type D/C are well adapted to bovine [21] and are, therefore, mostly involved in cattle botulism outbreaks. The absence of the MGE investigated here may be significant in a possible host-adaptation. This should be further investigated.

Yet, of the type D/C strains and samples tested, two strains and one sample showed to be positive for the developed MGE assays. This might indicate a phage exchange. Indeed, the only sample positive for *bont* type D/C in the MGE assays originated from a farm, which was also positive for *bont* type C/D. As known, the *bont* phage's instability could lead to formation of *bont*-phage-free bacteria indistinguishable from *C. novyi* [8]. These *bont*-phage-free bacteria could be re-infected by a phage containing either the *bont* locus C, C/D, D or D/C, turning back positive for the same *bont* type or a different one [2,22]. For example, if a *C. botulinum* group III type C/D bacterium lost p1, and is then re-infected by another phage containing the *bont* D/C locus, the re-infected bacterium would become a toxin type D/C strain with the genetic background of a type C/D. A similar exchange appears to have occurred among strains BKT2873 and BKT75002, which are genetically closely related to type D/C strains, but contained the *bont* C/D locus [23]. This could explain why two strains and one sample *bont* type D/C were tested positive for the mobilome MGE markers p2 to p6. Although the *bont* type D/C strains herein were mostly negative for the MGE included in the applied assay, they could contain other

MGE. To the authors' knowledge, no further information is available on MGE of *bont* type D/C that would warrant further investigation.

4.4. *Bont*-negative samples mobilome

Finally, out of the 344 samples negative for the *bont* genes, 31 were positive for MGE characteristics associated with the *C. botulinum* group III. This could indicate that these negative samples (obtained from confirmed botulism outbreaks) might contain cells belonging to *C. botulinum* group III that have lost the p1 *bont* phage, either in the environment prior to laboratory investigations or in the laboratory during the analysis process. These 31 samples, which originated from farms previously positive for botulism outbreaks, were all positive for the *C. novyi sensu lato* assay reinforcing this phage loss hypothesis.

4.5. *Clostridium botulinum* group III's mobilome could be influenced by CRISPR defense mechanism

As previously described, *C. botulinum* strains of type C/D mostly belong to the *C. novyi sensu lato* group Ia, while type D/C belong to group Ib [23], demonstrating a different genetic background. Accordingly, these findings showed *bont* type C/D strains contained MGE markers p2 to p6, while type D/C contained few MGE, thus, emphasizing their genetic differences. The diversity of MGE encountered in type C/D strains and the absence of MGE in type D/C could be explained by their defence mechanism against invasive DNA. In a previous study [10], the analysis of the CRISPR–Cas sequences, which are involved in adaptive immunity against invading genetic elements, revealed a putative inactivated mechanism in *bont* type C/D strains. This could explain the presence of many extrachromosomal elements observed in these strains. On the contrary, *bont* type D/C strains contain up to three fully functional CRISPR–Cas sequences, which could explain the absence of the MGE in the investigated type D/C strains. However, the inference of these observations may be limited as they were only confirmed *in silico*, and the strains and samples examined included *bont* type C/D more than type D/C.

5. Conclusion

Based on the findings obtained in this study, it appears the mobilome of *C. botulinum* group III BoNT type C/D and D/C strains or related contaminated samples are different. The evidence that BoNT type C/D and D/C do not share the same MGE may indicate that they are not usually found in the same ecological environment and/or are adapted to their host, mostly for BoNT type C/D in avian species and BoNT type D/C for bovine. The exact reasons for such differences remain to be elucidated. Understanding the dynamic and stability of the MGE, and their role in the onset of botulism, could be very useful to improve our understanding of the pathogenesis and management of animal outbreaks.

Acknowledgements

This project was made possible by financial support from the French Ministry of Agriculture; the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; and was supported by the ANIBOTNET project (funded by the Animal Health and Welfare ERA-Net).

We are grateful to Dr. Hanna Skarin from the Swedish veterinary agency for providing DNAs extract from *C. botulinum* group III strains during the AnibioThreat project. We are also grateful to Dr. Svenja Fohler and Dr. Hattie Webb for proofreading and helpful comments during the writing of the paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.009>.

References

- [1] F.A. Uzal, J.G. Songer, J.F. Prescott, M.R. Popoff, *Clostridial Diseases of Animals*, Wiley, 2016.
- [2] Y. Sakaguchi, T. Suzuki, Y. Yamamoto, A. Nishikawa, K. Oguma, Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains, *Res. Microbiol.* 166 (2015) 318–325, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.016>.
- [3] K. Oguma, The stability of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D, *J. Gen. Microbiol.* 92 (1976) 67–75, <https://doi.org/10.1099/00221287-92-1-67>.
- [4] M. Lindström, H. Korkeala, Laboratory diagnostics of botulism, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 298–314, <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006>.
- [5] E.-M. Hansbauer, M. Skiba, T. Endermann, J. Weisemann, D. Stern, M.B. Dorner, F. Finkenwirth, J. Wolf, W. Luginbühl, U. Messelhäuser, L. Bellanger, C. Woudstra, A. Rummel, P. Fach, B.G. Dorner, Detection, differentiation, and identification of botulinum neurotoxin serotypes C, CD, D, and DC by highly specific immunoassays and mass spectrometry, *Analyst* 141 (2016) 5281–5297, <https://doi.org/10.1039/c6an00693k>.
- [6] A. Tevell Åberg, K. Björnstad, M. Hedeland, Mass spectrometric detection of protein-based toxins, *Biosecur. Biodefense Strategy, Pract. Sci.* 11 (Suppl 1) (2013) S215–S226, <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0072>.
- [7] C. Le Maréchal, V. Ballan, S. Rouxel, M.-H. Bayon-Auboyer, M.-A. Baudouard, H. Morvan, E. Houard, T. Poëzevara, R. Souillard, C. Woudstra, S. Le Bouquin, P. Fach, M. Chemaly, Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism, *Anaerobe* 38 (2016) 7–13, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.014>.
- [8] H. Skarin, T. Häfström, J. Westerberg, B. Segerman, *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements, *BMC Genom.* 12 (2011) 185, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-185>.
- [9] H. Skarin, B. Segerman, Horizontal gene transfer of toxin genes in *Clostridium botulinum*: involvement of mobile elements and plasmids, *Mobile Genet. Elem.* 1 (2011) 213–215, <https://doi.org/10.4161/mge.1.3.17617>.
- [10] C. Woudstra, C. Le Maréchal, R. Souillard, M.-H. Bayon-Auboyer, I. Mermoud, D. Desoutter, P. Fach, New insights into the genetic diversity of *Clostridium botulinum* group III through extensive genome exploration, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 757, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00757>.
- [11] C. Woudstra, H. Skarin, F. Anniballi, L. Fenicia, L. Bano, I. Drigo, M. Koene, M.-H. Bayon-Auboyer, J.-P. Buffereau, D. De Medici, P. Fach, Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 3120–3127, <https://doi.org/10.1128/AEM.07568-11>.
- [12] P. Fach, J.P. Guillou, Detection by *in vitro* amplification of the alpha-toxin (phospholipase C) gene from *Clostridium perfringens*, *J. Appl. Bacteriol.* 74 (1993) 61–66.
- [13] C. Woudstra, C. Le Maréchal, R. Souillard, M.-H. Bayon-Auboyer, F. Anniballi, B. Auricchio, D. De Medici, L. Bano, M. Koene, M.-H. Sansonetti, D. Desoutter, E.-M. Hansbauer, M.B. Dorner, B.G. Dorner, P. Fach, Molecular gene profiling of *Clostridium botulinum* group III and its detection in naturally contaminated samples originating from various European countries, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 2495–2505, <https://doi.org/10.1128/AEM.03915-14>.
- [14] C. Le Maréchal, S. Rouxel, V. Ballan, E. Houard, T. Poezevara, M.-H. Bayon-Auboyer, R. Souillard, H. Morvan, M.-A. Baudouard, C. Woudstra, C. Mazuet, S. Le Bouquin, P. Fach, M. Popoff, M. Chemaly, Development and validation of a new reliable method for the diagnosis of avian botulism, *Plos One* 12 (2017), e0169640, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169640>.
- [15] L. Bano, I. Drigo, E. Tonon, S. Pascoletti, C. Puiatti, F. Anniballi, B. Auricchio, F. Lista, C. Montecucco, F. Agnoletti, Identification and characterization of *Clostridium botulinum* group III field strains by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Anaerobe* 48 (2017) 126–134, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.08.004>.
- [16] W. Wieggers, I. Just, H. Müller, A. Hellwig, P. Traub, K. Aktories, Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured *in vitro* by *Clostridium botulinum* C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase, *Eur. J. Cell Biol.* 54 (1991) 237–245.
- [17] D.N. Gerding, S. Johnson, M. Rupnik, K. Aktories, *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance, *Gut Microb.* 5 (2014) 15–27, <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>.
- [18] K. Amimoto, Y. Sasaki, S. Fukuyama, Y. Tamura, Genetic variation and cross-reactivity of *Clostridium septicum* alpha-toxin, *Vet. Microbiol.* 114 (2006) 51–59, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.039>.
- [19] I. Anza, H. Skarin, D. Vidal, A. Lindberg, V. Båverud, R. Mateo, The same clade of *Clostridium botulinum* strains is causing avian botulism in southern and northern Europe, *Anaerobe* 26 (2014) 20–23, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.01.002>.
- [20] B.G. Stiles, G. Barth, H. Barth, M.R. Popoff, *Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? *Toxins* 5 (2013) 2138–2160, <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>.

- [21] K. Nakamura, T. Kohda, K. Umeda, H. Yamamoto, M. Mukamoto, S. Kozaki, Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan, *Vet. Microbiol.* 140 (2010) 147–154, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.023>.
- [22] M.W. Eklund, F.T. Poysky, J.A. Meyers, G.A. Pelroy, Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage, *Science* 186 (1974) 456–458.
- [23] H. Skarin, B. Segerman, Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens, *PLoS One* 9 (2014), e107777, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107777>.

ANEXO 2: Resultados individuais e cálculos estatísticos dos estudos de homogeneidade e estabilidade das toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

DADOS TESTE HOMOGENEIDADE TOXINA C (Lote 01/2016)

n	x	y	x*y	x2	y	ycalc	res	res2
1	1	1	38	38	1	35,54198	2,458015	6,041839
2	1	1	36	36	1	35,54198	0,458015	0,209778
3	1	1	38	38	1	35,54198	2,458015	6,041839
4	1	1	34	34	1	35,54198	-1,54198	2,377717
5	1	1	34	34	1	35,54198	-1,54198	2,377717
6	2	2	38	76	4	35,55115	2,448855	5,996891
7	3	3	30	90	9	35,56031	-5,56031	30,917
8	4	4	34	136	16	35,56947	-1,56947	2,463222
9	5	5	38	190	25	35,57863	2,421374	5,863052
10	6	6	34	204	36	35,58779	-1,58779	2,521065
11	7	7	36	252	49	35,59695	0,403053	0,162452
12	8	8	36	288	64	35,60611	0,393893	0,155152
13	9	9	36	324	81	35,61527	0,384733	0,148019
14	10	10	36	360	100	35,62443	0,375573	0,141055
soma =		59	498	2100	389	498	6,39E-14	65,41679

b1 = 0,009
 sb1 = 0,197
 b0 = 35,533
 sb0 = 1,039
 sres = 2,335
 limite = -0,314 **HOMOGÊNEO**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA C (Lote 01/2016)

25°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	15	32	480	225	30,30865	1,691349	2,860663
2	15	32	480	225	30,30865	1,691349	2,860663
3	21	28	588	441	30,98131	-2,98131	8,888238
4	21	30	630	441	30,98131	-0,98131	0,962979
5	21	30	630	441	30,98131	-0,98131	0,962979
6	34	34	1156	1156	32,43875	1,561246	2,437488
soma =	127	186	3964	2929	186	0	18,97301

n = 6
 b1 = 0,112
 sb1 = 0,140
 b0 = 28,627
 sb0 = 3,101
 sres = 2,178
 limite -0,118 **ESTÁVEL**

5°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	15	30	450	225	29,20752	0,79248	0,628025
2	15	30	450	225	29,20752	0,79248	0,628025
3	30	32	960	900	28,39552	3,604483	12,9923
4	30	30	900	900	28,39552	1,604483	2,574366
5	90	24	2160	8100	25,14751	-1,14751	1,316769
6	90	20	1800	8100	25,14751	-5,14751	26,49681
7	90	20	1800	8100	25,14751	-5,14751	26,49681
8	90	24	2160	8100	25,14751	-1,14751	1,316769
9	150	24	3600	22500	21,89949	2,100506	4,412126
10	150	24	3600	22500	21,89949	2,100506	4,412126
11	150	24	3600	22500	21,89949	2,100506	4,412126
12	150	20	3000	22500	21,89949	-1,89949	3,608077
13	210	16	3360	44100	18,65148	-2,65148	7,030358
14	210	24	5040	44100	18,65148	5,348518	28,60664
15	210	20	4200	44100	18,65148	1,348518	1,8185
16	210	16	3360	44100	18,65148	-2,65148	7,030358
soma =	1890	378	40440	301050	378	-7,1E-15	133,7802

n = 16
 b1 = -0,054
 sb1 = 0,011
 b0 = 30,020
 sb0 = 1,520
 sres = 3,091
 limite -0,036 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA C (Lote 01/2016)

-20°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	21	32	672	441	27,80281	4,19719	17,6164
2	30	26	780	900	27,27958	-1,27958	1,637323
3	30	28	840	900	27,27958	0,720421	0,519006
4	90	20	1800	8100	23,79137	-3,79137	14,37452
5	90	24	2160	8100	23,79137	0,208626	0,043525
6	90	24	2160	8100	23,79137	0,208626	0,043525
7	90	20	1800	8100	23,79137	-3,79137	14,37452
8	150	20	3000	22500	20,30317	-0,30317	0,091912
9	150	20	3000	22500	20,30317	-0,30317	0,091912
10	150	24	3600	22500	20,30317	3,696831	13,66656
11	150	20	3000	22500	20,30317	-0,30317	0,091912
12	210	16	3360	44100	16,81496	-0,81496	0,664167
13	210	16	3360	44100	16,81496	-0,81496	0,664167
14	210	16	3360	44100	16,81496	-0,81496	0,664167
15	210	20	4200	44100	16,81496	3,185036	10,14445
soma =	1881	326	37092	301041	326	-2,8E-14	74,68807

n = 15
 b1 = -0,058
 sb1 = 0,009
 b0 = 29,024
 sb0 = 1,330
 sres = 2,397
 limite = -0,043 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA C (Lote 01/2016)

-80°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	30	26	780	900	25,38462	0,615385	0,378698
2	30	30	900	900	25,38462	4,615385	21,30178
3	90	16	1440	8100	24,07692	-8,07692	65,23669
4	90	20	1800	8100	24,07692	-4,07692	16,6213
5	90	20	1800	8100	24,07692	-4,07692	16,6213
6	90	28	2520	8100	24,07692	3,923077	15,39053
7	150	28	4200	22500	22,76923	5,230769	27,36095
8	150	24	3600	22500	22,76923	1,230769	1,514793
9	150	24	3600	22500	22,76923	1,230769	1,514793
10	150	24	3600	22500	22,76923	1,230769	1,514793
11	210	24	5040	44100	21,46154	2,538462	6,443787
12	210	24	5040	44100	21,46154	2,538462	6,443787
13	210	16	3360	44100	21,46154	-5,46154	29,8284
14	210	20	4200	44100	21,46154	-1,46154	2,136095
soma =	1860	324	41880	300600	324	2,13E-14	212,3077

n = 14
 b1 = -0,022
 sb1 = 0,018
 b0 = 26,038
 sb0 = 2,665
 sres = 4,206
 limite = 0,008 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE HOMOGENEIDADE ANTITOXINA C (Lote 01/2017)

n	x	y	x*y	x2	y	ycalc	res	res2
1	1	1	70	70	1	68,12977	1,870229	3,497756541
2	1	1	65	65	1	68,12977	-3,12977	9,795466465
3	1	1	70	70	1	68,12977	1,870229	3,497756541
4	1	1	65	65	1	68,12977	-3,12977	9,795466465
5	1	1	60	60	1	68,12977	-8,12977	66,09317639
6	2	2	70	140	4	68,26718	1,732824	3,002680496
7	3	3	75	225	9	68,40458	6,59542	43,49956296
8	4	4	75	300	16	68,54198	6,458015	41,70596119
9	5	5	70	350	25	68,67939	1,320611	1,744012587
10	6	6	70	420	36	68,81679	1,183206	1,399976691
11	7	7	65	455	49	68,9542	-3,9542	15,63568557
12	8	8	70	560	64	69,0916	0,908397	0,825185013
13	9	9	65	585	81	69,22901	-4,22901	17,88450556
14	10	10	70	700	100	69,36641	0,633588	0,401433483
soma =		59	960	4065	389	960	-1,4E-14	218,778626

b1 = 0,137
 sb1 = 0,360
 b0 = 67,992
 sb0 = 1,900
 sres = 4,270
 limite = -0,454 **HOMOGÊNEO**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA C (Lote 01/2017)

25°C

n	x	y	x*y	x2	y _{calc}	res	res2
1	7	60	420	49	66,72158	-6,72158	45,17966
2	7	65	455	49	66,72158	-1,72158	2,963843
3	7	60	420	49	66,72158	-6,72158	45,17966
					65,7846		
4	15	75	1125	225	67,79242	7,207578	51,94918
5	15	70	1050	225	67,79242	2,207578	4,873402
6	15	75	1125	225	67,79242	7,207578	51,94918
7	15	75	1125	225	67,79242	7,207578	51,94918
8	29	65	1885	841	69,66639	-4,66639	21,77522
9	29	70	2030	841	69,66639	0,333608	0,111294
10	29	65	1885	841	69,66639	-4,66639	21,77522
11	29	70	2030	841	69,66639	0,333608	0,111294
soma =	197	750	13550	4411	815,7846	1,42E-14	297,8171

n = 11
 b1 = 0,134
 sb1 = 0,194
 b0 = 65,785
 sb0 = 3,877
 sres = 5,752
 limite -0,184 **ESTÁVEL**

5°C (até 29 dias)

n	x	y	x*y	x2	y _{calc}	res	res2
1	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
2	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
3	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
4	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
5	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
6	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
7	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
soma =	161	525	12075	4039	519,8862	5,113834	4,210661

n = 7
 b1 = 0,000
 sb1 = 0,050
 b0 = 75,000
 sb0 = 1,203
 sres = 0,918
 limite 0,082 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA C (Lote 01/2017)

5°C (até 260 dias)

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
2	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
3	15	75	1125	225	74,57017	0,429831	0,184754
4	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
5	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
6	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
7	29	75	2175	841	74,04391	0,956086	0,9141
8	90	70	6300	8100	71,75095	-1,75095	3,065814
9	90	70	6300	8100	71,75095	-1,75095	3,065814
10	90	70	6300	8100	71,75095	-1,75095	3,065814
11	90	65	5850	8100	71,75095	-6,75095	45,57528
12	166	75	12450	27556	68,89413	6,105866	37,2816
13	166	75	12450	27556	68,89413	6,105866	37,2816
14	239	60	14340	57121	66,15009	-6,15009	37,82362
15	239	60	14340	57121	66,15009	-6,15009	37,82362
16	239	65	15535	57121	66,15009	-1,15009	1,322709
17	239	65	15535	57121	66,15009	-1,15009	1,322709
18	260	65	16900	67600	65,36071	-0,36071	0,13011
19	260	75	19500	67600	65,36071	9,639292	92,91594
soma =	2329	1340	157875	455235	1340	-9,9E-14	304,8853

n = 19
b1 = -0,038
sb1 = 0,010
b0 = 75,134
sb0 = 1,591
sres = 4,235
limite = -0,021 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA C (Lote 01/2017)

-20°C

n	x	y	x*y	x2	y _{calc}	res	res2
1	29	70	2030	841	69,54	0,460001	0,211601
2	29	70	2030	841	69,54	0,460001	0,211601
3	29	70	2030	841	69,54	0,460001	0,211601
4	90	70	6300	8100	71,48377	-1,48377	2,201575
5	90	75	6750	8100	71,48377	3,516229	12,36387
6	90	65	5850	8100	71,48377	-6,48377	42,03928
7	90	75	6750	8100	71,48377	3,516229	12,36387
8	166	75	12450	27556	73,90552	1,094481	1,197889
9	166	75	12450	27556	73,90552	1,094481	1,197889
10	166	70	11620	27556	73,90552	-3,90552	15,25308
11	239	75	17925	57121	76,23167	-1,23167	1,517015
12	239	75	17925	57121	76,23167	-1,23167	1,517015
13	239	80	19120	57121	76,23167	3,768328	14,2003
14	239	75	17925	57121	76,23167	-1,23167	1,517015
15	260	75	19500	67600	76,90084	-1,90084	3,613189
16	260	80	20800	67600	76,90084	3,099161	9,604799
soma =	2421	1175	181455	481275	1175	-2,8E-14	119,2216

n = 16
 b1 = 0,032
 sb1 = 0,009
 b0 = 68,616
 sb0 = 1,493
 sres = 2,918
 limite = 0,018 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA C (Lote 01/2017)

-80°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	7	60	420	49	68,6415	-8,6415	74,67544
2	7	70	490	49	68,6415	1,358505	1,845535
3	7	70	490	49	68,6415	1,358505	1,845535
4	15	60	900	225	68,8244	-8,8244	77,87002
5	15	70	1050	225	68,8244	1,175601	1,382037
6	15	70	1050	225	68,8244	1,175601	1,382037
7	15	65	975	225	68,8244	-3,8244	14,62603
8	29	75	2175	841	69,14448	5,855518	34,2871
9	29	75	2175	841	69,14448	5,855518	34,2871
10	29	65	1885	841	69,14448	-4,14448	17,17673
11	90	75	6750	8100	70,53913	4,460874	19,8994
12	90	75	6750	8100	70,53913	4,460874	19,8994
13	90	75	6750	8100	70,53913	4,460874	19,8994
14	90	75	6750	8100	70,53913	4,460874	19,8994
15	166	70	11620	27556	72,27672	-2,27672	5,183432
16	166	70	11620	27556	72,27672	-2,27672	5,183432
17	239	65	15535	57121	73,94572	-8,94572	80,02582
18	239	65	15535	57121	73,94572	-8,94572	80,02582
19	239	70	16730	57121	73,94572	-3,94572	15,56867
20	239	80	19120	57121	73,94572	6,054285	36,65436
21	260	80	20800	67600	74,42584	5,574161	31,07127
22	260	80	20800	67600	74,42584	5,574161	31,07127
soma =	2336	1560	170370	454766	1560	1,71E-13	623,7592

n = 22
b1 = 0,023
sb1 = 0,012
b0 = 68,481
sb0 = 1,766
sres = 5,585
limite 0,00 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE HOMOGENEIDADE TOXINA D (Lote 01/2017)

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2	
1	1	1	760	760	1	790,8397	-30,8397	951,086767
2	1	1	760	760	1	790,8397	-30,8397	951,086767
3	1	1	800	800	1	790,8397	9,160305	83,911194
4	1	1	800	800	1	790,8397	9,160305	83,911194
5	1	1	760	760	1	790,8397	-30,8397	951,086767
6	2	2	840	1680	4	796,3562	43,64377	1904,7783
7	3	3	840	2520	9	801,8728	38,12723	1453,6854
8	4	4	840	3360	16	807,3893	32,61069	1063,45691
9	5	5	760	3800	25	812,9059	-52,9059	2799,02922
10	6	6	840	5040	36	818,4224	21,57761	465,593173
11	7	7	880	6160	49	823,9389	56,06107	3142,84342
12	8	8	760	6080	64	829,4555	-69,4555	4824,06242
13	9	9	840	7560	81	834,972	5,02799	25,2806816
14	10	10	840	8400	100	840,4885	-0,48855	0,23868073
soma =		59	11320	48480	389	11320	6,82E-13	18700,0509

b1 = 5,517
 sb1 = 3,332
 b0 = 785,323
 sb0 = 17,564
 sres = 39,476
 limite = 0,052 **HETEROGÊNIO**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA D (Lote 01/2017)

25°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	7	760	5320	49	803,4505	-43,4505	1887,949
2	7	760	5320	49	803,4505	-43,4505	1887,949
3	7	760	5320	49	803,4505	-43,4505	1887,949
4	14	800	11200	196	799,1578	0,842191	0,709286
5	14	840	11760	196	799,1578	40,84219	1668,085
6	14	800	11200	196	799,1578	0,842191	0,709286
7	14	800	11200	196	799,1578	0,842191	0,709286
8	21	880	18480	441	794,8651	85,13491	7247,954
9	21	880	18480	441	794,8651	85,13491	7247,954
10	21	880	18480	441	794,8651	85,13491	7247,954
11	21	880	18480	441	794,8651	85,13491	7247,954
12	27	720	19440	729	791,1856	-71,1856	5067,391
13	27	720	19440	729	791,1856	-71,1856	5067,391
14	27	680	18360	729	791,1856	-111,186	12362,24
soma =	242	11160	192480	4882	11160	7,96E-13	58822,89

n = 14
b1 = -0,613
sb1 = 2,648
b0 = 807,743
sb0 = 49,456
sres = 70,014
limite 3,730 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA D (Lote 01/2017)

5°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	14	720	10080	196	749,0256	-29,0256	842,4882
2	14	680	9520	196	749,0256	-69,0256	4764,54
3	14	680	9520	196	749,0256	-69,0256	4764,54
4	14	680	9520	196	749,0256	-69,0256	4764,54
5	27	760	20520	729	750,7283	9,271713	85,96466
6	27	760	20520	729	750,7283	9,271713	85,96466
7	48	880	42240	2304	753,4787	126,5213	16007,64
8	48	880	42240	2304	753,4787	126,5213	16007,64
9	48	840	40320	2304	753,4787	86,52129	7485,934
10	48	880	42240	2304	753,4787	126,5213	16007,64
11	77	680	52360	5929	757,2769	-77,2769	5971,72
12	77	680	52360	5929	757,2769	-77,2769	5971,72
13	77	800	61600	5929	757,2769	42,7231	1825,263
14	85	600	51000	7225	758,3247	-158,325	25066,7
15	147	800	117600	21609	766,445	33,55504	1125,94
16	147	800	117600	21609	766,445	33,55504	1125,94
17	147	680	99960	21609	766,445	-86,445	7472,732
18	147	800	117600	21609	766,445	33,55504	1125,94
19	246	760	186960	60516	779,4112	-19,4112	376,7956
20	246	760	186960	60516	779,4112	-19,4112	376,7956
21	246	760	186960	60516	779,4112	-19,4112	376,7956
22	297	760	225720	88209	786,0908	-26,0908	680,7304
23	297	840	249480	88209	786,0908	53,90919	2906,201
24	297	840	249480	88209	786,0908	53,90919	2906,201
25	297	840	249480	88209	786,0908	53,90919	2906,201
26	365	760	277400	133225	794,9969	-34,9969	1224,785
27	365	760	277400	133225	794,9969	-34,9969	1224,785
soma =	3862	20680	3006640	923740	20680	-9,1E-13	133482,1

n = 27
 b1 = 0,131
 sb1 = 0,120
 b0 = 747,192
 sb0 = 22,180
 sres = 73,070
 limite = -0,066 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA D (Lote 01/2017)

-20°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	14	800	11200	196	750,9199	49,08012	2408,858
2	14	760	10640	196	750,9199	9,080121	82,4486
3	14	680	9520	196	750,9199	-70,9199	5029,629
4	14	680	9520	196	750,9199	-70,9199	5029,629
5	48	880	42240	2304	756,0702	123,9298	15358,6
6	48	880	42240	2304	756,0702	123,9298	15358,6
7	48	880	42240	2304	756,0702	123,9298	15358,6
8	48	840	40320	2304	756,0702	83,92981	7044,212
9	77	760	58520	5929	760,4631	-0,46311	0,21447
10	77	680	52360	5929	760,4631	-80,4631	6474,312
11	85	640	54400	7225	761,6749	-121,675	14804,79
12	85	640	54400	7225	761,6749	-121,675	14804,79
13	147	720	105840	21609	771,0667	-51,0667	2607,808
14	147	720	105840	21609	771,0667	-51,0667	2607,808
15	147	760	111720	21609	771,0667	-11,0667	122,4718
16	147	800	117600	21609	771,0667	28,9333	837,136
17	246	760	186960	60516	786,0632	-26,0632	679,2905
18	246	760	186960	60516	786,0632	-26,0632	679,2905
19	246	760	186960	60516	786,0632	-26,0632	679,2905
20	246	760	186960	60516	786,0632	-26,0632	679,2905
21	297	840	249480	88209	793,7887	46,21133	2135,487
22	297	840	249480	88209	793,7887	46,21133	2135,487
23	297	840	249480	88209	793,7887	46,21133	2135,487
24	297	760	225720	88209	793,7887	-33,7887	1141,675
25	365	840	306600	133225	804,0893	35,9107	1289,578
soma =	3697	19280	2897200	850869	19280	4,55E-13	119484,8

n = 25
b1 = 0,151
sb1 = 0,131
b0 = 748,799
sb0 = 24,110
sres = 72,076
limite = -0,063 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE TOXINA D (Lote 01/2017)

-80°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	7	800	5600	49	825,5507	-25,5507	652,8387
2	7	760	5320	49	825,5507	-65,5507	4296,895
3	7	800	5600	49	825,5507	-25,5507	652,8387
4	7	800	5600	49	825,5507	-25,5507	652,8387
5	14	840	11760	196	826,6638	13,33615	177,853
6	14	760	10640	196	826,6638	-66,6638	4444,068
7	14	800	11200	196	826,6638	-26,6638	710,9607
8	14	840	11760	196	826,6638	13,33615	177,853
9	21	800	16800	441	827,777	-27,777	771,5608
10	21	880	18480	441	827,777	52,22302	2727,244
11	21	880	18480	441	827,777	52,22302	2727,244
12	21	880	18480	441	827,777	52,22302	2727,244
13	27	760	20520	729	828,7311	-68,7311	4723,964
14	27	760	20520	729	828,7311	-68,7311	4723,964
15	27	760	20520	729	828,7311	-68,7311	4723,964
16	27	760	20520	729	828,7311	-68,7311	4723,964
17	48	840	40320	2304	832,0705	7,929489	62,8768
18	48	880	42240	2304	832,0705	47,92949	2297,236
19	48	880	42240	2304	832,0705	47,92949	2297,236
20	48	880	42240	2304	832,0705	47,92949	2297,236
21	77	880	67760	5929	836,6821	43,31792	1876,442
22	77	880	67760	5929	836,6821	43,31792	1876,442
23	77	880	67760	5929	836,6821	43,31792	1876,442
24	77	880	67760	5929	836,6821	43,31792	1876,442
25	85	840	71400	7225	837,9542	2,045765	4,185155
26	147	920	135240	21609	847,8134	72,18655	5210,898
27	147	920	135240	21609	847,8134	72,18655	5210,898
28	147	840	123480	21609	847,8134	-7,81345	61,04996
29	147	920	135240	21609	847,8134	72,18655	5210,898
30	246	840	206640	60516	863,5564	-23,5564	554,9032
31	246	840	206640	60516	863,5564	-23,5564	554,9032
32	246	760	186960	60516	863,5564	-103,556	10723,92
33	246	840	206640	60516	863,5564	-23,5564	554,9032
34	297	920	273240	88209	871,6664	48,33362	2336,139
35	297	880	261360	88209	871,6664	8,333618	69,44919
36	297	840	249480	88209	871,6664	-31,6664	1002,76
37	297	840	249480	88209	871,6664	-31,6664	1002,76
soma =	3621	31080	3100920	727153	31080	-2,7E-12	86573,32

n = 37
 b1 = 0,159
 sb1 = 0,081
 b0 = 824,438
 sb0 = 11,419
 sres = 49,735
 limite = 0,025 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE HOMOGENEIDADE ANTITOXINA D (Lote 01/2017)

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2	
1	1	55	55	55	1	55,7	-0,7	0,49
2	1	55	55	55	1	55,7	-0,7	0,49
3	1	55	55	55	1	55,7	-0,7	0,49
4	1	55	55	55	1	55,7	-0,7	0,49
5	1	55	55	55	1	55,7	-0,7	0,49
6	2	55	110	110	4	55,50909	-0,50909	0,259174
7	3	60	180	180	9	55,31818	4,681818	21,91942
8	4	55	220	220	16	55,12727	-0,12727	0,016198
9	5	55	275	275	25	54,93636	0,063636	0,00405
10	6	55	330	330	36	54,74545	0,254545	0,064793
11	7	55	385	385	49	54,55455	0,445455	0,19843
12	8	55	440	440	64	54,36364	0,636364	0,404959
13	9	55	495	495	81	54,17273	0,827273	0,68438
14	10	50	500	500	100	53,98182	-3,98182	15,85488
15	11	55	605	605	121	53,79091	1,209091	1,461901
soma =	70	825	3815	510	825	-7,1E-15	43,31818	

b1 = -0,191
 sb1 = 0,135
 b0 = 55,891
 sb0 = 0,786
 sres = 1,825
 limite 0,030 **HOMOGENEO**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA D (Lote 01/2017)

25°C

n	x	y	x*y	x2	y	ycalc	res	res2
1	7	55	385	49	51,27122	3,728778	13,90378	
2	7	55	385	49	51,27122	3,728778	13,90378	
3	7	50	350	49	51,27122	-1,27122	1,616006	
4	7	45	315	49	51,27122	-6,27122	39,32823	
5	14	50	700	196	49,97135	0,02865	0,000821	
6	14	50	700	196	49,97135	0,02865	0,000821	
7	14	50	700	196	49,97135	0,02865	0,000821	
8	14	50	700	196	49,97135	0,02865	0,000821	
9	34	45	1530	1156	46,25743	-1,25743	1,581125	
10	34	50	1700	1156	46,25743	3,742572	14,00685	
11	34	45	1530	1156	46,25743	-1,25743	1,581125	
12	34	45	1530	1156	46,25743	-1,25743	1,581125	
soma =	220	590	10525	5604	590	5,68E-14	87,50531	

n = 12
 b1 = -0,186
 sb1 = 0,075
 b0 = 52,571
 sb0 = 1,613
 sres = 2,958
 limite = -0,063 **INSTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA D (Lote 01/2017)

5°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	14	55	770	196	55,38574	-0,38574	0,148796
2	14	55	770	196	55,38574	-0,38574	0,148796
3	14	55	770	196	55,38574	-0,38574	0,148796
4	14	50	700	196	55,38574	-5,38574	29,00621
5	34	55	1870	1156	55,01049	-0,01049	0,00011
6	34	55	1870	1156	55,01049	-0,01049	0,00011
7	34	50	1700	1156	55,01049	-5,01049	25,10497
8	34	55	1870	1156	55,01049	-0,01049	0,00011
9	97	55	5335	9409	53,82843	1,171569	1,372574
10	97	55	5335	9409	53,82843	1,171569	1,372574
11	97	60	5820	9409	53,82843	6,171569	38,08826
12	97	55	5335	9409	53,82843	1,171569	1,372574
13	147	65	9555	21609	52,89029	12,10971	146,645
14	147	60	8820	21609	52,89029	7,109707	50,54794
15	186	45	8370	34596	52,15854	-7,15854	51,24476
16	186	50	9300	34596	52,15854	-2,15854	4,659314
17	221	50	11050	48841	51,50185	-1,50185	2,255546
18	221	45	9945	48841	51,50185	-6,50185	42,27402
soma =	1688	970	89185	253136	970	8,53E-14	394,3905

n = 18
b1 = -0,019
sb1 = 0,016
b0 = 55,648
sb0 = 1,912
sres = 4,965
limite = 0,008 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA D (Lote 01/2017)

-20°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	34	55	1870	1156	58,6855	-3,6855	13,58288
2	34	55	1870	1156	58,6855	-3,6855	13,58288
3	97	60	5820	9409	57,205	2,795001	7,812032
4	97	60	5820	9409	57,205	2,795001	7,812032
5	97	60	5820	9409	57,205	2,795001	7,812032
6	97	60	5820	9409	57,205	2,795001	7,812032
7	186	55	10230	34596	55,1135	-0,1135	0,012883
8	186	55	10230	34596	55,1135	-0,1135	0,012883
9	221	50	11050	48841	54,291	-4,291	18,41272
10	221	55	12155	48841	54,291	0,708996	0,502675
soma =	1270	565	70685	206822	565	-4,3E-14	77,35505

n = 10
 b1 = -0,023
 sb1 = 0,015
 b0 = 59,484
 sb0 = 2,096
 sres = 3,110
 limite = 0,000 **ESTÁVEL**

DADOS TESTE ESTABILIDADE ANTITOXINA D (Lote 01/2017)

-80°C

n	x	y	x*y	x2	ycalc	res	res2
1	7	55	385	49	54,55561	0,444394	0,197486
2	7	55	385	49	54,55561	0,444394	0,197486
3	7	50	350	49	54,55561	-4,55561	20,75355
4	7	50	350	49	54,55561	-4,55561	20,75355
5	14	50	700	196	54,59525	-4,59525	21,11628
6	14	55	770	196	54,59525	0,404755	0,163826
7	14	55	770	196	54,59525	0,404755	0,163826
8	14	55	770	196	54,59525	0,404755	0,163826
9	34	55	1870	1156	54,7085	0,291499	0,084972
10	34	55	1870	1156	54,7085	0,291499	0,084972
11	97	60	5820	9409	55,06526	4,934743	24,35169
12	97	60	5820	9409	55,06526	4,934743	24,35169
13	97	60	5820	9409	55,06526	4,934743	24,35169
14	97	60	5820	9409	55,06526	4,934743	24,35169
15	147	55	8085	21609	55,3484	-0,3484	0,12138
16	147	55	8085	21609	55,3484	-0,3484	0,12138
17	147	60	8820	21609	55,3484	4,651604	21,63742
18	186	50	9300	34596	55,56925	-5,56925	31,01649
19	186	50	9300	34596	55,56925	-5,56925	31,01649
20	221	55	12155	48841	55,76744	-0,76744	0,588968
11	221	55	12155	48841	55,76744	-0,76744	0,588968
soma =	1795	1155	99400	272629	1155	4,97E-14	246,1776

n = 21
b1 = 0,006
sb1 = 0,010
b0 = 54,516
sb0 = 1,188
sres = 3,600
limite = -0,011 **ESTÁVEL**

ANEXO 3: Modelos de Certificados para MRCs de estirpes de *Clostridium botulinum*, toxinas e antitoxinas botulínicas tipos C e D

CERTIFICADO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

Estirpe de *Clostridium botulinum* tipo C (CBC 02)



Nível de Biossegurança 3

Uso pretendido

Este produto destina-se a uso laboratorial e de pesquisa, podendo ser utilizado na produção de toxóides botulínicos de uso veterinário. Não é destinado a qualquer terapêutica humana.

Procedimento de propagação e manutenção

Meios de culturas empregados:

Cooked Meat Medium – CMM

Reinforced Clostridial Medium - RCM

Temperatura: 37 °C

Atmosfera: anaerobiose

1. Reconstituir a amostra liofilizada com 2 mL de meio de cultura RCM.
2. Inocular aproximadamente 1 mL da amostra reconstituída em um tubo de ensaio com rosca contendo de 10 a 20 mL do mesmo meio. Realizar esse procedimento em duplicata. *Obs: A coluna de ar no tubo deve ser pequena.*
3. Incubar a 37°C em anaerobiose por 24 a 48 horas, com fechamento em meia rosca. O crescimento deve ser evidenciado pela turbidez no caldo e formação de gás e espuma.
4. Para manutenção da estirpe, inocular uma alíquota do cultivo em RCM, no meio CMM, na proporção de 10% v/v e, após crescimento obtido pela incubação a 37°C, em anaerobiose por 48 horas, manter à temperatura ambiente.

Características fenotípicas

Em ágar sangue de carneiro 5% a estirpe forma colônias acinzentadas, difusas, beta-hemolíticas, com bordos irregulares. Em ágar gema de ovo, observa-se uma camada em tons de madrepérolas em torno das colônias (reação de lipase) e um halo esbranquiçado opaco de precipitação, dentro das colônias (reação de lecitinase).

No Gram, as bactérias apresentam-se como bastonetes Gram-positivo, retos ou levemente curvos, alguns com esporos subterminais.

Características genotípicas

A estirpe foi tipificada como *Clostridium botulinum* tipo C por PCR em tempo real (Woudstra *et al*, 2012).

O sequenciamento genômico foi realizado no sistema *HiSeq 2500* usando *HiSeq High Output V4 PE101* run (Illumina). As seqüências foram montadas em *CLC Genomics Workbench 8.0.2* e anotadas com o pipeline RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*). Comparações dos genomas sequenciados foram realizadas utilizando ferramentas do GenBank (NCBI).

A seqüência de nucleotídeos do gene *bont* da estirpe CBC 02, é 100% idêntica ao da estirpe D6F (nº de acesso AB745658), com 100% cobertura e 100% identidade, e muito próxima ao das estirpes CB-19 (nº de acesso AB200358), 571 (nº de acesso AB745657), 573 (nº de acesso AB200359) e C-Stockholm (nº de acesso AP008983), com 100% cobertura e 99% identidade.

Um desenho esquemático do complexo de proteínas codificado pelo *locus bont* da estirpe CBC 02 está apresentado na Figura 1, pelo *contig* 11 (NODE_11) com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT), proteínas acessórias (NTNH e HAS) e gene regulador da transcrição (*botR*).

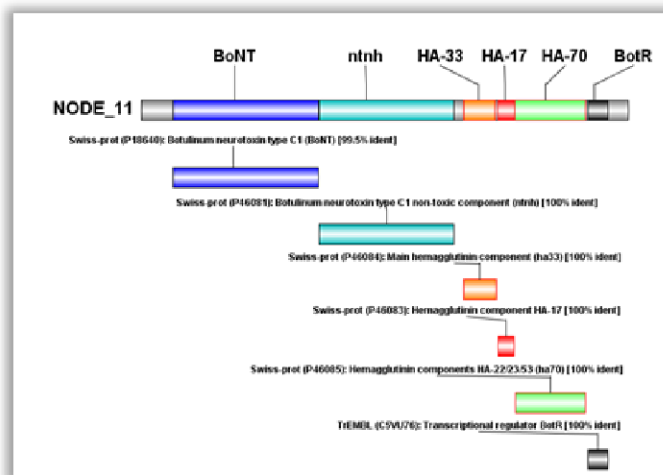


Figura 1 – Complexo de proteínas da estirpe CBC 02 (tipo C) no locus *bont*, com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT), proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*)

Nível de Biossegurança: 3

Este produto deve ser considerado potencialmente perigoso à saúde. Deve ser usado e descartado de acordo com os procedimentos de biossegurança nível 3, incluindo o uso de EPI e cabine de segurança biológica, bem como cuidados para evitar a geração de aerossóis. Cuidados também devem ser tomados para se evitar cortes no momento da abertura do frasco.

Garantia

O LFDA-MG não se responsabiliza por alterações decorrentes de manuseio inadequado durante o armazenamento do material nas instalações do cliente, especialmente após a abertura do frasco.

Validade: 2021

Obs: Consultar o produtor sobre possíveis ampliações do prazo de validade.

Citação da estirpe

Para citação dessa estirpe em publicações científicas utilizar: *Clostridium botulinum* tipo C (CBC 02, LFDA-MG).

Feedback dos usuários

Os usuários podem fornecer *feedback* sobre a adequação ou uso do material fornecido ou outros aspectos que considerem relevantes, utilizando o e-mail lanagro-mg@agricultura.gov.br.

Relatório de certificação

Relatório de certificação contendo resultados dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização encontra-se disponível ao usuário, mediante solicitação.

Referências

WOUNDSTRA, C. *et al.* Neurotoxin Gene Profiling of *Clostridium botulinum* Types C and D Native to Different Countries within Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.9, p.3120–3127, 2012.

CERTIFICADO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

Estirpe de *Clostridium botulinum* tipo D (CBD 09)



Nível de Biossegurança 3

Uso pretendido

Este produto destina-se a uso laboratorial e de pesquisa, podendo ser utilizado na produção de toxóides botulínicos de uso veterinário. Não é destinado a qualquer terapêutica humana.

Procedimento de propagação e manutenção

Meios de culturas empregados:

Cooked Meat Medium – CMM

Reinforced Clostridial Medium - RCM

Temperatura: 37 °C

Atmosfera: anaerobiose

1. Reconstituir a amostra liofilizada com 2 mL de meio de cultura RCM.
2. Inocular aproximadamente 1 mL da amostra reconstituída em um tubo de ensaio com rosca contendo de 10 a 20 mL do mesmo meio. Realizar esse procedimento em duplicata.
Obs: A coluna de ar no tubo deve ser pequena.
3. Incubar a 37°C em anaerobiose por 24 a 48 horas, com fechamento em meia rosca. O crescimento deve ser evidenciado pela turbidez no caldo e formação de gás e espuma.
4. Para manutenção da estirpe, inocular uma alíquota do cultivo em RCM, no meio CMM, na proporção de 10% v/v e, após crescimento obtido pela incubação a 37°C, em anaerobiose por 48 horas, manter à temperatura ambiente.

Características fenotípicas

Em ágar sangue de carneiro 5% a estirpe forma colônias acinzentadas, difusas, beta-hemolíticas, com bordos irregulares. Em ágar gema de ovo, observa-se uma camada em tons de madrepérolas em torno das colônias (reação de lipase) e um halo esbranquiçado opaco de precipitação, dentro das colônias (reação de lecitinase).

No Gram, as bactérias apresentam-se como bastonetes Gram-positivo, retos ou levemente curvos, alguns com esporos subterminais.

Características genotípicas

A estirpe foi tipificada como *Clostridium botulinum* tipo D por PCR em tempo real (Woudstra *et al*, 2012).

O sequenciamento genômico foi realizado no sistema *HiSeq 2500* usando *HiSeq High Output V4 PE101* run (Illumina). As seqüências foram montadas em *CLC Genomics Workbench 8.0.2* e anotadas com o pipeline RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*). Comparações dos genomas sequenciados foram realizadas utilizando ferramentas do GenBank (NCBI).

A seqüência de nucleotídeos do gene *bont* da estirpe CBD 09 é estreitamente relacionada a estirpe 1873 (nº de acesso AB012112), com 100% identidade e 99% cobertura.

Um desenho esquemático do complexo de proteínas codificado pelo *locus bont* da estirpe CBD 09 está apresentado na Figura 1, pelo *contig 6* com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT) proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*).

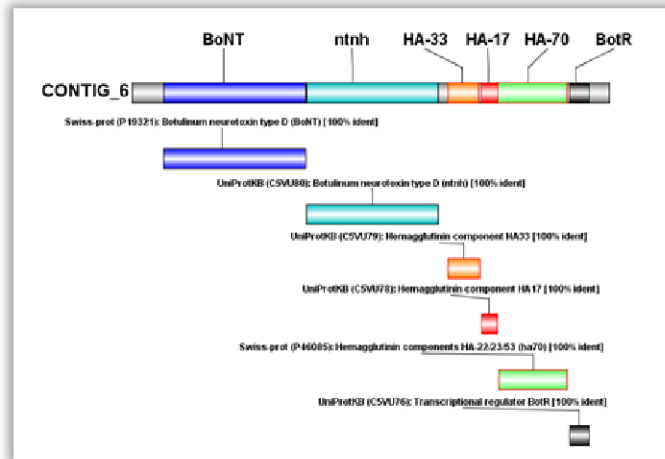


Figura 1 – Complexo de proteínas da estirpe CBD 09 (tipo D) no *locus bont*, com indicação da neurotoxina botulínica (BoNT), proteínas acessórias (NTNH e HAs) e gene regulador da transcrição (*botR*)

Nível de Biossegurança: 3

Este produto deve ser considerado potencialmente perigoso à saúde. Deve ser usado e descartado de acordo com os procedimentos de biossegurança nível 3, incluindo o uso de EPI e cabine de segurança biológica, bem como cuidados para evitar a geração de aerossóis. Cuidados também devem ser tomados para se evitar cortes no momento da abertura do frasco.

Garantia

O LFDA-MG não se responsabiliza por alterações decorrentes de manuseio inadequado durante o armazenamento do material nas instalações do cliente, especialmente após a abertura do frasco.

Validade: 2026

Obs: Consultar o produtor sobre possíveis ampliações do prazo de validade.

Citação da estirpe

Para citação dessa estirpe em publicações científicas utilizar: *Clostridium botulinum* tipo D (CBD 09, LFDA-MG).

Feedback dos usuários

Os usuários podem fornecer *feedback* sobre a adequação ou uso do material fornecido ou outros aspectos que considerem relevantes, utilizando o e-mail lanagro-mg@agricultura.gov.br.

Relatório de certificação

Relatório de certificação contendo resultados dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização encontra-se disponível ao usuário, mediante solicitação.

Referências

WOUDSTRA, C. *et al.* Neurotoxin Gene Profiling of *Clostridium botulinum* Types C and D Native to Different Countries within Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.9, p.3120–3127, 2012.

CERTIFICADO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

1. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Antitoxina Botulínica do Tipo C – Lote 01/2017	
Título: 55 UI	Incerteza expandida: ± 13 UI Rastreabilidade metrológica: propriedade determinada por estudo colaborativo utilizando método de bioensaio em camundongos, tendo como referência o Padrão de Toxina Botulínica Tipo C – MAPA – Lote 01/2011.
País de origem do material: Brasil. Produzido a partir do plasma de carneiros hiperimunizados com o toxóide homólogo do cultivo da estirpe de <i>Clostridium botulinum</i> tipo C, identificação CBC 02, pertencente ao LFDA-MG. O título foi determinado pela média das médias dos valores individuais obtidos no estudo colaborativo. A incerteza foi estabelecida combinando os valores de incerteza-padrão dos estudos de homogeneidade, estabilidade a curto e longo prazos e caracterização, e posteriormente convertida em incerteza expandida ($k=2$).	
Validade: Nov/2019 <i>Obs: Consultar o produtor sobre possíveis ampliações do prazo de validade.</i>	
Produtor: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG).	

2. METODO PARA CERTIFICAÇÃO

Bioensaio em camundongos (BRASIL, 2002).

3. USO PRETENDIDO

Este material foi produzido e caracterizado pelo LFDA-MG e destina-se a ser utilizado como padrão no teste de bioensaio em camundongo quando adotado na padronização de toxina botulínica do tipo C e no controle de vacinas anti-botulínicas de uso veterinário.

4. CONTEÚDO E CONCENTRAÇÃO

Cada frasco contém o resíduo liofilizado de 1,0 mL de uma solução de proteínas totais obtidas pela precipitação de plasma de carneiro por sulfato de amônio. Cada frasco

contém 55 UI de Antitoxina Botulínica do tipo C.

Para os efeitos deste documento, define-se título em UI como a recíproca da menor diluição da antitoxina, que misturada a 1 L+ da toxina homóloga, ainda causa a morte dos camundongos inoculados, em 72 horas.

5. USO DO MATERIAL

Para a finalidade a que se destina, esta antitoxina liofilizada deve ser reidratada com 1,0 mL de solução salina peptonada estéril (1% peptona, 0,25% NaCl, pH 7,2) para se obter 55 UI/mL.

Antes da reconstituição, assegurar que todo o pó esteja no fundo do frasco, a fim de evitar perda do conteúdo. Lembre-se: o frasco está sob VÁCUO.

Após a reidratação do resíduo liofilizado, alíquotar, em volumes que atendam a rotina do usuário, e congelar a -20°C. No momento do uso, diluir com o mesmo diluente para se obter a diluição de trabalho. No caso de teste de vacina anti-botulínica, diluir 1:11 para se obter 5 UI/mL.

6. ARMAZENAMENTO

Recomenda-se que os frascos não abertos sejam armazenados a temperatura igual ou inferior a -20°C.

Recomenda-se que, após a reconstituição, as alíquotas sejam armazenadas entre -30°C e -20°C.

O LFDA-MG não se responsabiliza por alterações decorrentes de manuseio inadequado durante o armazenamento do material nas instalações do usuário, especialmente após a abertura do frasco.

7. ESTABILIDADE

O material de referência é armazenado no LFDA-MG em equipamentos e instalações com temperatura controlada e demonstrou ser estável durante o período de validade proposto. Todo material de referência, tão logo seja recebido, deve ser armazenado conforme indicado.

8. PRECAUÇÕES

Este produto não é indicado para uso em humanos.

Como todo material de origem biológica, deve ser considerado potencialmente perigoso à saúde. Deve ser usado e descartado de acordo com os procedimentos de biossegurança do laboratório, incluindo o uso de EPI e cabine de segurança biológica, bem como cuidados para evitar a geração de aerossóis. Cuidados também devem ser tomados para se evitar acidentes no momento da abertura do lacre metálico.

9. RELATÓRIO DE CERTIFICAÇÃO

Relatório de certificação contendo resultados dos estudos de homogeneidade,

estabilidade e caracterização encontra-se disponível ao usuário, mediante solicitação.

10. INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DO MATERIAL (MSDS)

Propriedades físico-químicas	
Apresentação física: Pó liofilizado	Corrosivo: Não
Estável: Sim	Oxidante: Não
Higroscópico: Sim	Irritante: Não
Inflamável: Não	Manuseio: Veja precauções (Item 8)
Propriedades toxicológicas	
Efeitos da inalação: Não estabelecido, evite a inalação.	
Efeitos da ingestão: Não estabelecido, evite a ingestão.	
Efeitos da absorção através da pele: Não estabelecido, evite contato com a pele.	
Primeiros socorros sugeridos	
Inalação: Procure orientação médica.	
Ingestão: Procure orientação médica.	
Contato com os olhos: Lave generosamente com água, procure orientação médica.	
Contato com a pele: Lave com água.	
Providências em caso de derramamento	
O derramamento do conteúdo do frasco deve ser recolhido com material absorvente embebido em um desinfetante apropriado. A superfície atingida deve ser lavada com água. O material absorvente usado para conter o derramamento deve ser tratado como resíduo biológico.	

11. FEEDBACK DOS USUÁRIOS

Os usuários podem fornecer *feedback* sobre a adequação ou uso do material fornecido ou outros aspectos que considerem relevantes, utilizando o e-mail lanagro-mg@agricultura.gov.br.

12. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23 de 18.03.2002. D.O.U. de 20.03.2002, Seção 1, pag. 10-11. Brasília. 2002.

CERTIFICADO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

1. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Toxina Botulínica do Tipo D – Lote 01/2017	
Título: 950 L+	Incerteza expandida: $\pm 153 L+$ Rastreabilidade metrológica: propriedade determinada por estudo colaborativo, utilizando método de bioensaio em camundongos, tendo como referência o Padrão de Antitoxina Botulínica Tipo D - MAPA – Lote 02/2017.
País de origem do material: Brasil. Produzido a partir do cultivo da estirpe de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D, identificação CBD 09, pertencente ao LFDA-MG. O título foi determinado pela média das médias dos valores individuais obtidos no estudo colaborativo. A incerteza foi estabelecida combinando os valores de incerteza-padrão dos estudos da homogeneidade, estabilidade a curto e longo prazo, e caracterização, e posteriormente convertida em incerteza expandida ($k = 2$).	
Validade: Set/2019 <i>Obs: Consultar o produtor sobre possíveis ampliações do prazo de validade.</i>	
Produtor: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG).	

2. METODO PARA CERTIFICAÇÃO

Bioensaio em camundongos (BRASIL, 2002).

3. USO PRETENDIDO

Este material foi produzido e caracterizado pelo LFDA-MG e destina-se a ser utilizado como padrão para avaliar a concentração de anticorpos anti-botulínicos do tipo D no soro de animais vacinados com o toxóide homólogo pelo método de bioensaio em camundongos, no controle de vacinas anti-botulínicas.

4. CONTEÚDO E CONCENTRAÇÃO

Cada frasco contém o resíduo liofilizado de 1,0 mL de um cultivo filtrado e concentrado de *Clostridium botulinum* tipo D em meio

nutriente. Cada frasco contém 950 L+ de toxina botulínica do tipo D.

Para os efeitos deste documento, define-se título em L+ como a menor quantidade de toxina que, uma vez misturada a 1UI de antitoxina homóloga, ainda é capaz de matar os camundongos inoculados, em 72 horas

5. USO DO MATERIAL

Para a finalidade a que se destina, esta toxina liofilizada deve ser reidratada com 1,0 mL de solução salina peptonada estéril (1% peptona, 0,25% NaCl, pH 7,2) para se obter 950 L+/mL.

Antes da reconstituição, assegurar que todo o pó esteja no fundo do frasco, a fim de evitar perda do conteúdo. Lembre-se: o frasco está sob VÁCUO.

Após a reidratação do resíduo liofilizado, diluir a 1:19 com o mesmo diluente para se obter 50 L+/mL, alíquotar, em volumes que atendam a rotina do usuário, e congelar a -20°C.

No momento do uso, diluir com solução salina peptonada estéril (1% peptona, 0,25% NaCl, pH 7,2) para se obter a diluição de trabalho. No caso de teste de vacina anti-botulínica, diluir 1:50 para se obter 1 L+/mL.

6. ARMAZENAMENTO

Recomenda-se que os frascos não abertos sejam armazenados a temperatura igual ou inferior a -20°C.

Recomenda-se que, após a reconstituição, as alíquotas sejam armazenadas entre -30°C e -20°C.

O LFDA-MG não se responsabiliza por alterações decorrentes de manuseio inadequado durante o armazenamento do material nas instalações do usuário, especialmente após a abertura do frasco.

7. ESTABILIDADE

O material de referência é armazenado no LFDA-MG em equipamentos e instalações com temperatura controlada e demonstrou ser estável durante o período de validade proposto. Todo material de referência, tão logo seja recebido, deve ser armazenado conforme indicado.

8. PRECAUÇÕES

Este produto não é indicado para uso em humanos.

Como todo material de origem biológica, deve ser considerado potencialmente perigoso à saúde. Deve ser usado e descartado de acordo com os procedimentos de biossegurança do laboratório, incluindo o uso de EPI e cabine de segurança biológica, bem como cuidados para evitar a geração de aerossóis. Cuidados também devem ser tomados para se evitar acidentes no momento da abertura do lacre metálico.

9. INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DO MATERIAL (MSDS)

Propriedades físico-químicas	
Apresentação física: Pó liofilizado	Corrosivo: Não
Estável: Sim	Oxidante: Não
Higroscópico: Sim	Irritante: Não
Inflamável: Não	Manuseio: Veja precauções (Item 8)
Propriedades toxicológicas	
Efeitos da inalação: Não estabelecido, evite a inalação.	
Efeitos da ingestão: Não estabelecido, evite a ingestão.	
Efeitos da absorção através da pele: Não estabelecido, evite contato com a pele.	
Primeiros socorros sugeridos	
Inalação: Procure orientação médica.	
Ingestão: Procure orientação médica.	
Contato com os olhos: Lave generosamente com água, procure orientação médica.	
Contato com a pele: Lave com água.	
Providências em caso de derramamento	
O derramamento do conteúdo do frasco deve ser recolhido com material absorvente embebido em um desinfetante apropriado. A superfície atingida deve ser lavada com água. O material absorvente usado para conter o derramamento deve ser tratado como resíduo biológico.	

10. RELATÓRIO DE CERTIFICAÇÃO

Relatório de certificação contendo resultados dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização encontra-se disponível ao usuário, mediante solicitação.

11. FEEDBACK DOS USUÁRIOS

Os usuários podem fornecer *feedback* sobre a adequação ou uso do material fornecido ou outros aspectos que considerem relevantes, utilizando o e-mail lanagro-mg@agricultura.gov.br.

12. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23 de 18.03.2002. D.O.U. de 20.03.2002, Seção 1, pag. 10-11. Brasília. 2002.

CERTIFICADO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

1. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Antitoxina Botulínica do Tipo D – Lote 01/2017	
Título: 50 UI	Incerteza expandida: ± 13 UI Rastreabilidade metrológica: propriedade determinada por estudo colaborativo, utilizando método de bioensaio em camundongos, tendo como referência o Padrão de Toxina Botulínica Tipo D – MAPA – Lote 02/2007.
País de origem do material: Brasil. Produzido a partir do plasma de carneiros hiperimunizados com o toxóide homólogo do cultivo da estirpe de <i>Clostridium botulinum</i> tipo D, identificação CBD 09, pertencente ao LFDA-MG. O título foi determinado pela média das médias dos valores individuais obtidos no estudo colaborativo. A incerteza foi estabelecida combinando os valores de incerteza-padrão dos estudos de homogeneidade, estabilidade a curto e longo prazos e caracterização, e posteriormente convertida em incerteza expandida ($k=2$).	
Validade: Nov/2019 <i>Obs: Consultar o produtor sobre possíveis ampliações do prazo de validade.</i>	
Produtor: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG).	

2. METODO PARA CERTIFICAÇÃO

Bioensaio em camundongos (BRASIL, 2002).

3. USO PRETENDIDO

Este material foi produzido e caracterizado pelo LFDA-MG e destina-se a ser utilizado como padrão no teste de bioensaio em camundongo quando adotado na padronização de toxina botulínica do tipo D e no controle de vacinas anti-botulínicas de uso veterinário.

4. CONTEÚDO E CONCENTRAÇÃO

Cada frasco contém o resíduo liofilizado de 1,0 mL de uma solução de proteínas totais obtidas pela precipitação de plasma de carneiro por sulfato de amônio. Cada frasco

contém 50 UI de Antitoxina Botulínica do tipo D.

Para os efeitos deste documento, define-se título em UI como a recíproca da menor diluição da antitoxina, que misturada a 1 L+ da toxina homóloga, ainda causa a morte dos camundongos inoculados, em 72 horas.

5. USO DO MATERIAL

Para a finalidade a que se destina, esta antitoxina liofilizada deve ser reidratada com 1,0 mL de solução salina peptonada estéril (1% peptona, 0,25% NaCl, pH 7,2) para se obter 50 UI/mL.

Antes da reconstituição, assegurar que todo o pó esteja no fundo do frasco, a fim de evitar perda do conteúdo. Lembre-se: o frasco está sob VÁCUO.

Após a reidratação do resíduo liofilizado, alíquotar, em volumes que atendam a rotina do usuário, e congelar a -20°C. No momento do uso, diluir com o mesmo diluente para se obter a diluição de trabalho. No caso de teste de vacina anti-botulínica, diluir 1:10 para se obter 5 UI/mL.

6. ARMAZENAMENTO

Recomenda-se que os frascos não abertos sejam armazenados a temperatura igual ou inferior a -20°C.

Recomenda-se que, após a reconstituição, as alíquotas sejam armazenadas entre -30°C e -20°C.

O LFDA-MG não se responsabiliza por alterações decorrentes de manuseio inadequado durante o armazenamento do material nas instalações do usuário, especialmente após a abertura do frasco.

7. ESTABILIDADE

O material de referência é armazenado no LFDA-MG em equipamentos e instalações com temperatura controlada e demonstrou ser estável durante o período de validade proposto. Todo material de referência, tão logo seja recebido, deve ser armazenado conforme indicado.

8. PRECAUÇÕES

Este produto não é indicado para uso em humanos.

Como todo material de origem biológica, deve ser considerado potencialmente perigoso à saúde. Deve ser usado e descartado de acordo com os procedimentos de biossegurança do laboratório, incluindo o uso de EPI e cabine de segurança biológica, bem como cuidados para evitar a geração de aerossóis. Cuidados também devem ser tomados para se evitar acidentes no momento da abertura do lacre metálico.

9. RELATÓRIO DE CERTIFICAÇÃO

Relatório de certificação contendo resultados dos estudos de homogeneidade,

estabilidade e caracterização encontra-se disponível ao usuário, mediante solicitação.

10. INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DO MATERIAL (MSDS)

Propriedades físico-químicas	
Apresentação física: Pó liofilizado	Corrosivo: Não
Estável: Sim	Oxidante: Não
Higroscópico: Sim	Irritante: Não
Inflamável: Não	Manuseio: Veja precauções (Item 8)
Propriedades toxicológicas	
Efeitos da inalação: Não estabelecido, evite a inalação.	
Efeitos da ingestão: Não estabelecido, evite a ingestão.	
Efeitos da absorção através da pele: Não estabelecido, evite contato com a pele.	
Primeiros socorros sugeridos	
Inalação: Procure orientação médica.	
Ingestão: Procure orientação médica.	
Contato com os olhos: Lave generosamente com água, procure orientação médica.	
Contato com a pele: Lave com água.	
Providências em caso de derramamento	
O derramamento do conteúdo do frasco deve ser recolhido com material absorvente embebido em um desinfetante apropriado. A superfície atingida deve ser lavada com água. O material absorvente usado para conter o derramamento deve ser tratado como resíduo biológico.	

11. FEEDBACK DOS USUÁRIOS

Os usuários podem fornecer *feedback* sobre a adequação ou uso do material fornecido ou outros aspectos que considerem relevantes, utilizando o e-mail lanagro-mg@agricultura.gov.br.

12. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23 de 18.03.2002. D.O.U. de 20.03.2002, Seção 1, pag. 10-11. Brasília. 2002.