

Patrícia Martins Parreiras

T636.089 69

P259e

2001

**ELISA COMPETITIVO PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINA
ANTIPROTOTOXINA EPSILON PRODUZIDA PELO
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPO D**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato.

Belo Horizonte-MG
UFMG – Escola de Veterinária
2001

P259e Parreiras, Patrícia Martins, 1972-

ELISA competitivo para detecção de imunglobulina antiprototoxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D / Patrícia Martins Parreiras. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

44p.: il.

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

1. *Clostridium perfringens* – Teses. 2. ELISA – Teses. 3. Vacinas veterinárias – Teses. I. Título.

CDD – 616.931

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

14/09/01

705401-07

0310-28460

Dissertação defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2001, pela Comissão Examinadora constituída por:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Carlos Faria Lobato".

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
(Orientador)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Zélia Inês Portela Lobato".

Profa. Zélia Inês Portela Lobato

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andrey Pereira Lage".

Prof. Andrey Pereira Lage

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luiz Guilherme Dias Heneine".

Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Vera Lúcia Viegas de Abreu".

Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu

Dedico este trabalho a *Jesus Cristo*
por meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, Marcelo, Tinice e principalmente minha mãe, pelo grande amor dedicado a mim.

Ao querido Prof. Francisco Lobato pela orientação, amizade, confiança e incentivo.

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, pela orientação, companheirismo e tranquilidade.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, pelo exemplo e pela demonstração de amizade.

À Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato, pela demonstração de apoio.

À Prof^a Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela tranquilidade que nos transmite.

À Prof^a. Maria Auxiliadora Roque, pelos ensinamentos e exemplo de amor à vida acadêmica.

Ao Colegiado de Pós-Graduação, na pessoa do Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do LARA/PL, na pessoa do Dr. Tomaz de Aquino Porfírio, pelas facilidades oferecidas.

A todos que compõem a equipe de trabalho do Laboratório de Doenças Bacterianas – EV-UFMG e Laboratório de Imunologia - FUNED em especial ao Ronnie Assis, por todo apoio.

À todos que contribuíram para a realização desta pesquisa em favor dos animais.

*"Buscai primeiro o reino de Deus e a
sua justiça, e tudo mais vos será
acrescentado."
Mt 7, 7-11*

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. LITERATURA CONSULTADA	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Local de Realização do Trabalho	16
3.1.1. Animais Utilizados	16
3.1.2. Soros, Toxinas e Antitoxinas Utilizadas para Teste	16
3.2. Produção e Purificação de Toxinas	16
3.2.1. Amostra de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D	16
3.2.2. Meios de Cultura	16
3.2.3. Preparo do Inóculo e avaliação da Pureza da Amostra	17
3.2.4. Produção e Concentração de Toxina Epsilon	17
3.2.5. Teste de Toxicidade	17
3.2.6. Dosagem Protéica	17
3.2.7. Purificação de Toxina	17
3.2.7.1. Eletroforese	18
3.2.8. Ativação e Teste de Toxicidade da Prototoxina Epsilon Purificada	19
3.2.9. Destoxificação da Prototoxina Epsilon por Iodação Controlada e Análise da Preservação Protéica	19
3.3. Produção de Soro-hiperimune	19
3.3.1. Purificação do Soro-Hiperimune	19
3.4. Elisa Competitivo para Detecção de Antitoxina Epsilon	20
3.4.1. Estabelecimento das Diluições do antígeno, Imunoglobulina de Coelho e do Conjugado Anticoelho	20
3.4.2. Desenvolvimento do ELISA Indireto	20
3.4.3. Elaboração da Curva Padrão	20
3.4.4. Cálculo da Porcentagem de Inibição	21
3.4.5. Avaliação dos Soros	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Avaliação da Pureza da Amostra e Teste de Toxicidade	21
4.1.1. Purificação de toxinas	21
4.1.2. Eletroforese	22
4.1.3. Dosagem Protéica	25
4.1.4. Destoxificação e Preservação da Prototoxina Epsilon por Iodação Controlada ..	27
4.1.5. Avaliação da Especificidade da Imunoglobulina de Coelho	29

4.2.	ELISA Competitivo para Detecção de Antitoxina Epsilon.....	31
4.2.1.	Padronização da Técnica	31
4.2.2.	Elaboração da Curva Padrão.....	32
4.2.3.	Controle do Teste	34
4.2.3.1.	Seleção dos Pontos da Curva Padrão	34
4.2.3.2.	Avaliação da Repetibilidade do Teste de ELISA Competitivo	35
4.2.3.3.	Titulação da Antitoxina Padrão pelo ELISA Competitivo.....	35
4.2.4.	Verificação da Aplicação do Teste ELISA Competitivo	37
4.2.5.	Avaliação dos Soros dos Bovinos.....	38
5. CONCLUSÕES.....		41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados das dosagens de proteína (mg/mL) de uma mesma alíquota da prototoxina epsilon utilizando os métodos de Bradford (1976), Lowry et al. (1951) e coeficiente de extinção (1973).....	25
Tabela 2.	Análise da preservação da prototoxina epsilon não iodada e iodada, quando submetida às temperaturas de -20°C e -80°C por um período de seis meses.....	29
Tabela 3.	Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos valores em logaritmo neperiano (Ln) e a média da porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo.....	33
Tabela 4.	Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos valores em logaritmo neperiano (Ln) e porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo.....	34
Tabela 5.	Concentração da antitoxina padrão (UI/mL) obtidos pela soroneutralização (SN), desvio padrão (\bar{S}) e coeficiente de variação (CV) dos resultados da porcentagem de inibição obtidas pelo ELISA.....	35
Tabela 6.	Antitoxina epsilon padrão calculada pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo.....	36
Tabela 7.	Títulos dos soros (UI/mL) dos carneiros a, b e c calculados a partir da curva padrão elaborada na própria placa do teste e calculados pela curva padrão média de várias placas, com seus respectivos coeficientes de variação (CV).....	37
Tabela 8.	Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos logaritmo neperiano (Ln) e porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo.....	39
Tabela 9.	Resultados dos testes de soroneutralização em camundongos e ELISA competitivo, realizados em soros de bovinos vacinados com duas doses de toxóide C e D contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	40

Tabela 10.	Níveis de antitoxina epsilon dos soros dos bovinos que apresentaram títulos aos 42 e 56 dias após a primovacinação, pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo	40
------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático do sistema de cromatografia Pharmacia. As setas indicam o sentido do fluxo.....	18
Figura 2.	Perfil cromatográfico da purificação da prototoxina epsilon produzida pelo <i>Clostridium perfringens</i> tipo D com os picos 1, 2 e 3.	22
Figura 3.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pelo azul de comassie (A) e prata (B), de amostras do cultivo oriundo de diferentes lotes de produção de prototoxina epsilon não purificada.	23
Figura 4.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) da prototoxina epsilon purificada corado pela prata.....	25
Figura 5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pela prata....	27
Figura 6.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pela prata... ..	29
Figura 7.	Curva da imunoglobulina antiepsilon produzida em coelho, nas diluições de 1:100 a 1:1600, com a toxina alfa e prototoxina epsilon adsorvidas na placa.....	31
Figura 8.	Curva da imunoglobulina antiepsilon de coelho, nas diluições de 1:200 a 1:102400	32
Figura 9.	Curva padrão que ilustra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidas no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.	33
Figura 10.	Curva padrão que ilustra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidas no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.	34
Figura 11.	Correlação entre os títulos da antitoxina epsilon padrão obtidos pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo.....	36
Figura 12.	Correlação entre os títulos dos soros dos carneiros calculados através da curva da própria placa do teste e através da curva padrão média de várias placas.....	38
Figura 13.	Curva padrão ilustrando a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidos no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.	39
Figura 14.	Correlação entre a potência dos soros dos bovinos obtida pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo.....	41

RESUMO

Padronizou-se o ELISA competitivo para detecção de anticorpos contra a prototoxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D como alternativa a substituir o método da soroneutralização em camundongos para teste de potência de vacinas. As placas foram sensibilizadas com a prototoxina epsilon, purificada em coluna de DEAE – Sepharose CL 6B equilibrada com tampão fosfato 0,01 M pH 7,2. Os soros foram testados pela capacidade de inibir a reação padronizada no ELISA entre a imunoglobulina de coelho e a prototoxina epsilon. A potência do soro teste foi calculada a partir de uma curva padrão elaborada com o Padrão Internacional de imunoglobulina anti-epsilon. Soros de bovinos, vacinados contra *C. perfringens* tipos C e D, foram testados pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo e o coeficiente de correlação foi 0,87. A aplicabilidade e repetição do teste foi mensurada utilizando uma curva padrão previamente elaborada utilizando soro testado em diferentes dias e então comparados com o teste de soroneutralização em camundongos. O coeficiente de correlação foi 0,94.

Palavras-Chave: *Clostridium perfringens*, prototoxina epsilon, ELISA competitivo

ABSTRACT

Competitive ELISA was standardized to detect antibodies to *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin as alternative to the toxin neutralization test performed in mice which is used for the measurement of antibody responses in animals vaccinated with clostridial vaccines. Microwell plates were coated with epsilon prototoxin purified by DEAE – Sepharose column equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2 detoxified by controlled iodination. Sera were tested for their ability to inhibit the standard ELISA reaction between rabbit anti-epsilon immunoglobulin and the epsilon prototoxin. The potency of the test serum was calculated from a standard curve produced with the International Standard anti-epsilon immunoglobulin. Cattle sera, vaccinated with clostridial vaccines by *C. perfringens* type C and D, were tested by titration in mice and competitive ELISA, the correlation coefficient was 0.87. The applicability and repetibility of the test was measured by using a previously elaborated standard curve to obtain the ELISA inhibition potency of many test serum assayed in different days and compare them to the neutralization assay. The correlation coefficient of the test serum potency was 0.94.

Key-Words: *Clostridium perfringens*, epsilon prototoxin, competitive ELISA

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium*, compreende um grupo de microorganismos anaeróbios formadores de esporos, de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado no solo, pastagens, água doce e salgada, alimentos de origem vegetal e animal e como habitante normal do trato digestivo dos animais e do homem.

Dentre as doenças causadas pelos diversos tipos de *Clostridium perfringens*, as enterotoxemias merecem destaque pela capacidade de provocar morte, principalmente em animais mais jovens, entre três dias e seis meses de idade, ou por retardo no crescimento daqueles que sobrevivem à infecção determinando consideráveis perdas econômicas aos criadores (Itodo et al., 1983, Sigurdarson & Thorsteinsson, 1990; Silveira et al., 1995).

A enterotoxemia é a principal doença causada por *Clostridium perfringens* tipo D em ovinos, caprinos e bovinos quando submetidos a fatores que alteram a microbiota intestinal, como mudança brusca de alimentação e estresse pós desmame, com morte súbita após o início dos sintomas (El Idrissi & Ward, 1992a). Em ruminantes, alimentação rica em carboidratos e com baixo teor de fibra bruta, provoca alteração da flora normal, degeneração e calosidade das vilosidades do rúmen. O excesso de carboidratos no duodeno, especialmente glucose e frutose, estimula o crescimento de *C. perfringens* residente e conseqüentemente a produção de toxinas (Sakurai et al., 1997). *C. perfringens* tipo D produz toxinas alfa e epsilon (Worthington et al., 1973) sendo a toxina epsilon a principal envolvida no desenvolvimento da enterotoxemia após sua ativação por enzimas proteolíticas, pois é produzida na forma não tóxica conforme descrito por Thomson (1963) e Orleans et al. (1960) (Habeed, 1975, Sakurai et al., 1997).

A evolução da doença em animais jovens é quase sempre de caráter agudo ou super agudo, dificultando qualquer medida terapêutica. Entretanto, o processo pode ser

prevenido através da imunização com vacinas monovalentes ou polivalentes. No Brasil, observa-se o incremento na produção e uso de vacinas contra as clostridioses. Em 1999 foram produzidas 116 milhões de doses de vacinas, sendo que 55 milhões foram vacinas polivalentes com diferentes combinações de *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. novyi* (Lobato et al., 2000). Entretanto, apenas as vacinas contra *C. botulinum* e *C. chauvoei* são submetidos a controle oficial de potência (Brasil, 1994, 1997).

Em pesquisa realizada para verificar a eficiência de vacinas contra botulismo, uma das mais importantes clostridioses em bovinos, foi demonstrado que os toxóides foram pouco eficientes para estimular a produção de anticorpos nos animais inoculados (Lobato, 1989). Esses dados sugerem que a qualidade dos imunógenos nacionais devem ser estudadas pois a medida que outras vacinas sejam testadas resultados semelhantes podem aparecer. Por outro lado, o controle oficial permitirá que produtos de melhor qualidade sejam fornecidos ao mercado consumidor. O estabelecimento do acordo de Mercado Comum do Cone Sul, MERCOSUL, impõe aos países membros uma tomada de posição mais enérgica em relação ao controle de qualidade dos insumos agropecuários e produtos biológicos, sobretudo em função do intercâmbio comercial entre estes países (Azevedo, 1998).

Atualmente, utiliza-se a técnica de soroneutralização em camundongos para diagnóstico de enterotoxemia e para teste de potência de vacinas contra o *Clostridium perfringens* tipo D. O fato de utilizar animais de laboratório tem trazido discussões éticas por parte de grupos humanitários. A soroneutralização em camundongos, que foi utilizada pela primeira vez há mais de 50 anos, será abolida por 29 países europeus, que estarão promovendo um fórum de discussão a fim de regularizar e aceitar testes alternativos até o final de 2001. O objetivo é que milhões de animais sejam

polpados com redução do sofrimento além de implicar em menor custo nas pesquisas (Filho, 2000).

A necessidade de reduzir ou eliminar testes em animais levou a um aumento, em todo mundo, da investigação e desenvolvimento de técnicas *in vitro* que apresentam vantagens em relação a testes *in vivo*. Além de evitar questionamentos bioéticos, os testes *in vitro* apresentam-se rápidos, específicos, sensíveis e com viabilidade econômica maior que a soroneutralização em camundongos (El Idrissi & Ward, 1992b).

Testes alternativos serão de grande benefício e resultarão em substancial redução do número de animais utilizados no teste de potência de vacinas contra enterotoxemia causada pela toxina epsilon do *C. perfringens* tipo D.

Este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica do ensaio imunoenzimático ELISA competitivo e comparar a sensibilidade da mesma com a soroneutralização em camundongos na titulação de anticorpos vacinais frente ao toxóide epsilon.

2 LITERATURA CONSULTADA

A causa da enterotoxemia foi estabelecida pela primeira vez em 1932, na Austrália, quando detectou-se a toxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D no conteúdo intestinal de carneiros e posteriormente em 1954 no conteúdo intestinal de bovinos adultos através de ensaios *in vivo* (Griner et al., 1956). Desde então, vários trabalhos sobre o assunto, vêm sendo publicados.

O teste mais comumente utilizado para o diagnóstico é a soroneutralização em camundongos (El Idrissi & Ward, 1992a), que necessita de longo período e de grande número de camundongos para sua realização. Além destes inconvenientes, falhas ocorrem em decorrência de variações na sensibilidade do animal e por toxicidade não específica causada por outras substâncias que podem estar presentes nas amostras clínicas, particularmente em conteúdo intestinal (Naylor et al., 1987).

Mesmo este teste sendo conhecido como sensível, ele é lento e pode ser em parte impreciso, além de ser considerado relativamente caro em razão do uso de um grande número de animais (Wood, 1991).

Entre os testes *in vitro* utilizados para detecção de toxina epsilon, como alternativa ao teste de soroneutralização em camundongos, o ELISA sanduíche tem apresentado melhores resultados para detecção desta em conteúdo intestinal (Weddell & Worthington, 1984; Martin et al., 1988; El Idrissi & Ward, 1992a, 1992b), sendo sensível, quantitativo, comparável a soroneutralização, rápido, específico e dando resultados qualitativos dentro de quatro horas, ao contrário das 48 horas necessárias para a soroneutralização em animais (Naylor et al., 1987), além de ser considerado ético e economicamente importante.

O teste de ELISA com anticorpos específicos pode ser desenvolvido para detectar toxinas beta, epsilon e iota. Nagahama et al. (1991) descreveram que o ELISA sanduíche foi sensível o suficiente para detectar quantidades como 1 ng/mL de toxina beta e iota purificada e 0,1 ng/mL de toxina epsilon purificada.

Diversos métodos de ELISA têm sido descritos, tais como, ELISA sanduíche e por competição. El Idrissi & Ward (1992a) usaram o ELISA sanduíche para diagnóstico de enterotoxemia que foi capaz de detectar 2 ng/mL de prototoxina epsilon purificada. A mesma técnica para detectar toxinas de *C. perfringens* no conteúdo intestinal mostrou sensibilidade e especificidade de 90,5% e 89,2%, 97,4% e 94,6% para as toxinas beta e epsilon, respectivamente, quando comparada com a técnica de soroneutralização (El Idrissi & Ward, 1992b).

Testes *in vitro* também têm sido descritos como de fundamental importância para os laboratórios que fabricam vacinas, autoridades da saúde animal e pesquisadores pois o mercado de imunógenos veterinários requer segurança e eficácia dos produtos utilizados. O teste de potência é a parte complexa e crítica da

segurança das vacinas veterinárias e sua validação é determinada pela especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Levings et al., 1993).

A potência de vacinas pode ser avaliada por processos como a enumeração de organismos viáveis ou através da dosagem de proteínas no inóculo antes da inativação e adição de adjuvante. Existe necessidade de um teste de potência antes do lote ser liberado e que permita análise do produto também quando disponível no mercado (Levings et al., 1993).

Azevedo et al. (1998) determinaram os níveis de antitoxinas beta e epsilon de *C. perfringens* induzidas em coelhos por seis vacinas comercializadas no Brasil e um toxóide C e D padrão e observaram que somente o toxóide importado induziu respostas de anticorpos neutralizantes. Lobato et al. (2000) avaliaram a resposta de antitoxina beta e epsilon de *C. perfringens* em bovinos e coelhos vacinados contra *C. perfringens* tipos C e D com seis vacinas disponíveis no mercado e um toxóide padrão C e D. Nos coelhos, apenas duas vacinas, nomeadas T2 e T4, induziram títulos satisfatórios de anticorpos contra as toxinas beta e epsilon, que foram superiores aos títulos mínimos exigidos de 10 UI/mL e 5 UI/mL respectivamente, para aprovação da vacina (European Pharmacopeia, 1998). A vacina T2 induziu títulos de anticorpos de 22,6 e 5,6 UI/mL e a vacina T4 11,2 e 7,0 UI/mL contra toxinas beta e epsilon, respectivamente. Nos bovinos, apenas T2 induziu médias dos títulos de anticorpos de 1,15 e 0,42 UI/mL no dia 42 e 8,0 e 4,27 UI/mL no dia 56 contra as toxinas beta e epsilon respectivamente, similares ao toxóide padrão 2,02 e 0,97 UI/mL no dia 42 e 10,03 e 4,98 UI/mL no dia 56. Normalmente as técnicas empregadas para controle desses toxóides são realizadas pela imunização de coelhos e os títulos de anticorpos séricos obtidos são determinados pelo bioensaio em camundongos, tornando-se um processo laborioso além de gerar discussões bioéticas (El Idrissi & Ward, 1992b). De acordo com Uzal et al. (1997), para compreender melhor a resposta imunológica de um animal a vacina contra

C. perfringens tipo D, é necessário um método simples, específico e sensível, que permita o processamento do soro de um grande número de animais.

Como descrito para o diagnóstico de enterotoxemia, os testes *in vitro*, particularmente o ensaio imunoenzimático, são reprodutíveis e podem ser automatizados (Knight et al., 1990a; Uzal et al., 1997). A técnica de ELISA permite ser utilizada na rotina laboratorial, apresentando baixo custo e a cada análise 30 animais podem ser testados por placa (Levings et al., 1993). Além disso, a mesma discussão ética sobre o uso de animais em testes laboratoriais, anteriormente descrito para o diagnóstico, também ocorre sobre o teste de potência de vacinas realizado através da soroneutralização em camundongos.

O uso do ELISA para teste de potência de toxóides clostridiais está em fase de consolidação na Inglaterra e vem sendo introduzido com sucesso nos Laboratórios Hoechst como alternativa ao teste de soroneutralização em animais de laboratório (Wood, 1991). Nagahama et al. (1991) relataram que o ELISA pode ser de 10 a 1000 vezes mais sensível que a soroneutralização em camundongos, sendo o ensaio imunoenzimático referido como útil e passível de substituir o ensaio *in vivo*.

Wood (1991) descreveu um método alternativo ao teste de soroneutralização em camundongos para determinação de anticorpos contra as toxinas de *C. tetani*, *C. septicum*, *C. novyi* tipo B e toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D. Nesse trabalho padronizou-se o ELISA indireto e utilizaram como padrão, soros previamente avaliados através da soroneutralização em camundongos, contendo 50 UI/mL para *C. tetani*, 20 UI/mL para *C. novyi* tipo B, 9 UI/mL para *C. septicum* e 20 UI/mL para toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D. O coeficiente de correlação entre os títulos obtidos através da soroneutralização em camundongos e os obtidos no ELISA foi de 0,94 para *C. septicum*, 0,93 para *C. tetani*, 0,84 para *C. novyi* e 0,93 para toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D.

Uzal et al. (1997) padronizaram as técnicas do ELISA indireto e ELISA competitivo e avaliaram a eficiência das mesmas em detectar antitoxinas epsilon no soro de cabras comparando-as com a soroneutralização em camundongos. Utilizaram soro hiperimune produzido em cabra com título de anticorpos anti-epsilon de 723 UI/mL mensurados pela soroneutralização em camundongos. O coeficiente de correlação entre o ELISA indireto e a soroneutralização em camundongos, para detecção de antitoxinas epsilon, foi de 0,99 enquanto que para o ELISA competitivo foi de 0,98.

Sojka et al. (1989) padronizaram a técnica do ELISA competitivo e a comparou com a soroneutralização em camundongos. Utilizaram como padrão soro previamente avaliado pela soroneutralização em camundongos contendo 20 UI/mL. No teste, soros avaliados competiam na ligação entre o anticorpo monoclonal, que neutralizava a toxina epsilon, e o toxóide epsilon adsorvido à placa. Como resultado obtiveram que o coeficiente de correlação entre o ELISA competitivo e a soroneutralização foi de 0,93.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Local de Realização do Trabalho

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

3.1.1. Animais Utilizados

Camundongos de ambos os sexos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 e 20g, foram fornecidos pelo LARA-PL e biotério da FUNED.

Coelhos machos da raça Nova Zelândia, com peso entre 1,5 e 2,5 Kg, foram

adquiridos da fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa da EV - UFGM.

Carneiros fornecidos pelo LARA - PL, sendo dois adultos e um cordeiro nascido durante a realização do experimento.

3.1.2. Soros, Toxinas e Antitoxinas Utilizadas para Teste

Utilizaram-se soros de 40 bovinos previamente vacinados com duas doses de toxóide contra *Clostridium perfringens* tipo C e D comercializados no Brasil, titulados quanto a presença de antitoxina epsilon através do teste de soroneutralização em camundongos, cedidos pelo Laboratório de Anaeróbios da EV - UFGM. A primeira dose foi administrada no dia zero do experimento e a segunda 42 dias após. Os animais foram sangrados nos dias zero, 42 e 56.

Soro hiperimune antitoxina epsilon de *C. perfringens* tipo D, produzido em carneiros fornecidos pelo LARA-PL.

Antitoxina epsilon padrão produzida em equino, contendo 1020 unidades internacionais por ampola, adquirida no National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) e toxina alfa (Animal and Plant Health Inspection Service - APHIS).

3.2. Produção e Purificação de Toxinas

3.2.1. Amostra de *Clostridium perfringens* tipo D

A prototoxina epsilon foi produzida a partir de amostra de *Clostridium perfringens* tipo D fornecida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária - INTA - Bariloche-Argentina.

3.2.2. Meios de Cultura

Para avaliação da pureza da amostra, provas bioquímicas (fermentação da glicose, maltose, sacarose) e produção de toxinas foram empregados os seguintes meios de cultura: caldo tioglicolato¹, agar sangue² de carneiro a 5%, agar Sahid Ferguson

¹ Dignolab, Barcelona, Espanha.

² E. Merck, Darmstadt, Germany

Perfringens¹ (SFP), meio peptona – extrato de levedura pré reduzido e esterilizado em anaerobiose (PY – PRAS)² e meio para produção de toxinas (Uzal et al., 2000).

3.2.3. Preparo do Inóculo e Avaliação da Pureza da Amostra

Para o preparo do inóculo as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1 mL de tioglicolato e transferidos para cinco tubos de ensaio (16x160 mm) com tampa de rosca contendo 10 mL de tioglicolato e incubados por 18 horas a 37°C. Após esse período, as culturas foram semeadas em agar sangue e incubadas por 24 horas. Do meio sólido, as colônias características de *C. perfringens* foram submetidas ao método de Gram e provas bioquímicas a fim de se verificar a pureza da amostra (Sebald & Petit, 1997).

3.2.4. Produção e Concentração de Toxina Epsilon

A produção de prototoxinas foi realizada a partir da transferência do inóculo obtido em 10 mL de caldo tioglicolato diretamente para o meio de produção de toxinas, na proporção de 2,5 % e incubado por oito horas. Todas as incubações foram realizadas em jarras de anaerobiose com mistura gasosa¹ contendo 10% de CO₂, 10% de H₂, 80% de N₂ e mantidas a 37°C (Azevedo et al., 1998).

Após o período de incubação, o cultivo foi centrifugado 8000 x g, por 30 minutos a 4°C para a remoção de células e fragmentos. O sobrenadante da cultura foi concentrado a 1/10 do volume inicial, pelo Sistema de Filtração Amicon (Millipore)³ a 4°C, utilizando membrana com retenção acima de 10 Kd e mantido a -80°C até o início da purificação da prototoxina.

3.2.5. Teste de Toxicidade

As prototoxinas do concentrado, foram ativadas com uma solução de tripsina²

(Sebald & Petit, 1997). A mistura foi mantida em banho - maria a 37°C, por 30 minutos e inoculada em quatro camundongos pesando entre 17 e 20g, na dose de 0,2 mL por via endovenosa e os animais foram observados por 72 horas (Sebald & Petit, 1997). Como controle, inocularam-se camundongos com o concentrado não tratado pela tripsina.

3.2.6. Dosagem Protéica

Para a dosagem protéica foram avaliados três métodos: método de Lowry et al. (1951), método do coeficiente de extinção descrito por Worthington et al. (1973) e o método de Bradford (1976).

3.2.7. Purificação de Toxina

Ao concentrado, após avaliado quanto a toxicidade, para cada 100 mL adicionou-se 35g de sulfato de amônio, homogeneizando lentamente por agitação durante 30 minutos e mantido 12 horas em repouso a 4°C. O precipitado foi separado por centrifugação a 12000 x g, a 4°C por 30 minutos, ressuspenso a 10% do volume inicial, com tampão fosfato 0,01 M (pH 7,2) e dialisado contra o mesmo tampão a 4°C, com um total de três trocas (El Idrissi & Ward, 1992a).

A purificação foi realizada em coluna de troca iônica DEAE Sepharose⁴ CL 6B, com altura de 9,4cm, diâmetro de 2,2cm e o volume total de 35 mL (Figura 1). Para determinar a molaridade do tampão fosfato em que a prototoxina epsilon seria obtida, fez-se um gradiente de concentração entre o tampão fosfato 0,005 M pH 7,2 (C₁) e NaCl 1M (C₂). Dessa forma, o tampão passado na coluna teve sua molaridade aumentada gradativamente. Todo o processo foi monitorado através do registrador do coletor de fração.

¹ E. Merck, Darmstadt, Germany

² Difco Laboratories Ltda.

³ Millipore Corporation

⁴ Pharmacia, Sweden

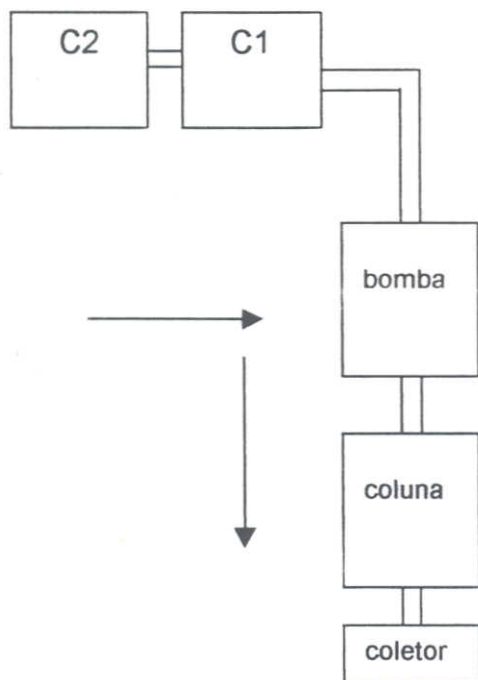


Figura 1: Desenho esquemático do sistema de cromatografia Pharmacia. As setas indicam o sentido do fluxo.

A cromatografia foi padronizada para uma velocidade de fluxo 16 mL por hora, coletando-se 10 mL por tubo quando 3,5 mL do concentrado era aplicado na coluna.

O cálculo da concentração do tampão para eluição da proteína da coluna foi feito utilizando-se a fórmula que se segue (Work & Work, 1975):

$$C = C_2 - (C_2 - C_1) (1 - v / V)$$

C = concentração do gradiente

C₁ = concentração inicial do tampão fosfato (0,005M)

C₂ = concentração do tampão limite (NaCl 1M)

v = volume do tampão coletado até aparecer o pico da toxina no registrador

V = volume inicial de tampão (somatório do volume do tampão fosfato com o NaCl)

O gradiente de concentração foi elaborado de maneira que o tampão limite em C₂ fosse transferido para o tampão fosfato em C₁. Dessa forma, a molaridade seria aumentada gradativamente até o ponto que teria força

suficiente para eluir a prototoxina epsilon da coluna.

Tendo o perfil cromatográfico da prototoxina epsilon eluída durante o gradiente de concentração, que se apresentou na forma de picos, fez-se ajuste fino da cromatografia testando individualmente diferentes molaridades do tampão fosfato pH 7,2 (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07) para verificar a molaridade exata que a prototoxina epsilon seria totalmente eluída. O eluato foi coletado em tubos de hemólise e aqueles com material do primeiro pico, que de acordo com Uzal et al. (1997) contém a prototoxina epsilon, foram individualmente dialisados em água destilada a 4°C, com três trocas da água a cada três horas e posteriormente testados quanto ao perfil eletroforético (Laemmli, 1970) e toxicidade (Sebald & Petit, 1997).

3.2.7.1. Eletroforese

A prototoxina epsilon não purificada, precipitada pelo sulfato de amônio e aquela após a purificação cromatográfica, foram submetidas à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970).

O volume de amostra aplicado por canaleta foi de 10 µL. Em todas as eletroforeses incluíram-se marcadores padrões de peso molecular (SIGMA)¹: albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e inibidor de tripsina (20,1 kDa).

Coloração do Gel

Coloração pela prata

Utilizou-se a metodologia descrita por Tunon & Johanson (1984). Terminada a eletroforese o gel foi lavado rapidamente em água destilada e colocado em solução fixadora (metanol 40%, ácido acético 10%, água destilada 50%). Em seguida o gel foi lavado durante cinco minutos com água destilada cinco vezes. Fixado em glutaraldeído a 10%, por 30 minutos e

¹ Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

lavado como anteriormente. Seguiu-se a incubação do gel, durante sete minutos, em solução de prata preparada da seguinte forma: misturando 21 mL de NaOH 0,36%; 1,4 mL de NH_4OH 25% e gotejando AgNO_3 19,4% até a solução ficar turva. Em seguida lavou-se o gel com água destilada durante cinco minutos, cinco vezes e adicionou-se solução reveladora preparada da seguinte forma: 2,5 mL de ácido acético a 10%; 0,27 mL de formaldeído e completando-se o volume, para 500 mL, com água destilada.

Quando as bandas começaram a aparecer adicionou-se ácido acético a 5%. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob agitação lenta.

Coloração pelo azul de comassie

Após eletroforese e rápida lavagem, o gel foi mantido, por 30 minutos em uma solução corante contendo 0,25% (p:v) de azul comassie R-250 em 45,44% de metanol, 9,08% ácido acético em água destilada. Logo após, seguia-se a descoloração utilizando-se uma solução contendo 45,5% de metanol e 9,05% de ácido acético até se obter a diferenciação das bandas coradas. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob agitação lenta.

3.2.8. Ativação e Teste de Toxicidade da Prototoxina Epsilon Purificada

A ativação e teste de toxicidade da prototoxina epsilon purificada foi verificada conforme descrito no item 3.2.5.

3.2.9. Destoxificação da Prototoxina Epsilon por Iodação Controlada e Análise da Preservação Protéica

O eluato do primeiro pico da cromatografia, após analisados em gel de poliácridamida e teste de toxicidade para comprovação da presença da toxina epsilon, foram imediatamente liofilizados e destoxificados através do método da iodação controlada conforme descrito por Heneine & Heneine (1998).

Para análise da preservação protéica, parte da prototoxina não iodada e parte iodada

foram mantidas a -20°C e a -80°C para uso e posterior avaliação da taxa de degradação por um período de seis meses.

3.3. Produção de Soro-hiperimune

Os carneiros foram imunizados com a prototoxina epsilon purificada e iodada. O esquema de imunização constituiu-se de quatro aplicações por via subcutânea de 1200 μL cada, com intervalo de 21 dias. O inóculo constituiu-se de 600 μL de adjuvante completo de Freund e prototoxina epsilon iodada diluída em 600 μL de PBS 0,1 M, sendo 400 μg da proteína na primeira e segunda doses, 800 μg na terceira e 1600 μg na quarta dose, e 10 dias após esta, os animais foram sangrados via veia jugular. Os animais receberam uma dose de reforço contendo 800 μg de proteína 20 dias após a quarta dose e com 10 dias fez-se nova sangria. O cordeiro foi sangrado 30, 45 e 55 dias após a ingestão do colostro.

Os coelhos imunizados receberam quatro aplicações do mesmo tóxico, nas mesmas condições descritas para os carneiros, em intervalos de 15 dias, sendo 100 μg de proteína na primeira e segunda doses, 800 μg na terceira e 1600 μg na última, 10 dias após a última dose, os animais foram sangrados via veia marginal da orelha. Os soros dos carneiros e dos coelhos foram processados e armazenados de acordo com Azevedo (1997).

3.3.1. Purificação do Soro-Hiperimune

As imunoglobulinas foram purificadas por cromatografia de afinidade onde a prototoxina epsilon foi fixada à coluna Sepharose CL 4B, preparada conforme instruções do fabricante. A seguir as imunoglobulinas foram concentradas pelo método de liofilização conforme Worthington et al. (1973).

Avaliou-se a especificidade da imunoglobulina de coelho, através do ELISA indireto, utilizando-se prototoxina epsilon purificada e toxina alfa para sensibilização das placas, imunoglobulina de coelho e o conjugado antiespécie. A imunoglobulina de

coelho nas diluições de 1:100 até 1:1600, sendo 2 o fator de diluição, foi adicionada nesta ordem aos orifícios sensibilizados com o intuito de verificar a curva da imunoglobulina. O teste foi realizado em duas placas, sendo dois orifícios para cada diluição.

3.4. Elisa Competitivo para Detecção de Antitoxina Epsilon

3.4.1. Estabelecimento das Diluições do Antígeno, Imunoglobulina de Coelho e do Conjugado Anticoelho

Determinou-se as diluições dos componentes do ensaio imunoenzimático que permitem absorvância 1,0, numa faixa de 0-2 a 492 nm. Avaliou-se o antígeno nas concentrações de um, dois, cinco e 10 µg/mL, diferentes diluições de duas alíquotas de imunoglobulina de coelho purificada com dosagem protéica de 16,66mg/mL e 0,289 mg/mL e o conjugado imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de coelho, conjugada à peroxidase – SIGMA, diluído conforme instruções do fabricante com o objetivo de utilizá-los para detecção de antitoxina epsilon conforme descrito por Uzal et al. (1997).

3.4.2. Desenvolvimento do ELISA Indireto

Desenvolveu-se o ELISA indireto para posterior padronização do ELISA competitivo para titulação de antissoros. A prototoxina epsilon iodada foi adsorvida à placa de ELISA¹ de 96 orifícios, sendo 100 µL em cada orifício, diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6, permanecendo a 4°C durante a noite. Seguiram-se duas lavagens em tampão de lavagem de ELISA - TSE (0,9% de NaCl, 0,05% de Tween 20 em água destilada, pH 7,2). Cada orifício foi bloqueado com 200 µL de albumina - SIGMA 3%, seguindo-se incubação durante 60 minutos a 37°C. Novamente as placas foram lavadas com TSE adicionando-se em seguida a cada orifício 100 µL da imunoglobulina anti-epsilon

de coelho diluída de 200 a 102400 vezes em PBS pH 7,2 contendo 0,05 % de Tween 20. Após a incubação durante 60 minutos a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com TSE. O conjugado imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de coelho, conjugado à peroxidase – SIGMA, diluído em PBS pH 7,2 contendo 0,1% de Tween-20, foi adicionado no volume de 100 µL por orifício incubando-se por 60 minutos a 37°C.

As placas foram lavadas seis vezes com TSE adicionando-se a seguir 100 µL do substrato enzimático (orto-fenilenodiamino – SIGMA) com peróxido de hidrogênio preparado em tampão citrato pH 5,0. Após a incubação à temperatura de 37°C por 60 minutos a reação enzimática foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico na diluição de 1:20. A intensidade da coloração foi determinada em leitor de ELISA² a 492nm. O controle do conjugado foi realizado em dois orifícios desenvolvendo todas as etapas descritas acima, exceto a adição da imunoglobulina de coelho (Uzal et al., 1997).

3.4.3. Elaboração da Curva Padrão

Para elaboração da curva padrão, a antitoxina epsilon padrão contendo 1020 unidades internacionais (UI) por ampola, foi utilizada na técnica desenvolvida no item anterior. Após suspendida, conforme instruções do fabricante, a antitoxina epsilon padrão foi diluída para conter as seguintes concentrações: 5,100, 2,550, 1,275, 0,213, 0,053 e 0,027 UI/mL. Para cada uma das diluições, 50 µL foi colocado junto com um mesmo volume de imunoglobulina de coelho, esta a 50% da diluição previamente padronizada, para ambas competirem pela prototoxina epsilon adsorvida na placa.

O quanto a antitoxina epsilon padrão inibia a ligação da imunoglobulina de coelho a prototoxina epsilon adsorvida na placa foi expresso em porcentagem de inibição e a partir destes valores elaborou-se a curva padrão correlacionando essa porcentagem de inibição com a potência em unidades

¹ Lip – Equipment & Services LTD

² Labsystems Multiskan MS

internacionais (UI/mL) do soro padrão (Uzal et al., 1997). O ensaio foi repetido em oito placas.

3.4.4. Cálculo da Porcentagem de Inibição

Na interpretação dos resultados foram sempre considerados os controles zero e 100% de inibição da ligação da imunoglobulina de coelho com a prototoxina epsilon adsorvida na placa.

Em cada placa de ELISA a coluna 1 foi considerada como branco e coluna 12 foi usada para o controle onde ocorria 100 % de ligação, ou seja, 0 % de inibição. O 100% de inibição foi o ponto da menor diluição da antitoxina epsilon padrão.

A porcentagem de inibição, utilizando-se números relativos (Uzal et al., 1997), foi calculada como se segue:

$$\%I = \frac{t \times 100}{z}$$

x = 0% de inibição

y = 100 % de inibição

t = x - absorbância do soro teste

z = x - y

3.4.5 Avaliação dos Soros

A potência dos soros avaliados foi determinada matematicamente, pela análise de regressão e coeficiente de correlação. Utilizou-se para controle do método a antitoxina epsilon padrão, em concentrações correspondentes a 1, 2, 5 e 10 UI/mL, testadas em quatro placas, sendo dois orifícios para cada diluição e para avaliação da repetibilidade do teste de ELISA competitivo padronizado neste experimento foram selecionadas as concentrações de 5,100, 2,550, e 1,275UI/mL e calculados os coeficientes de variação intraplaca e interplaca. Os soros dos bovinos foram testados em duas placas assim como os soros dos carneiros, sendo dois orifícios para cada teste.

Para todas as análises calculou-se o coeficiente de correlação da potência dos soros obtida pelo ELISA e pela soroneutralização em camundongos. Em todas as placas também foram elaborados um controle negativo, 0% de inibição, e três

controles positivos utilizando o soro padrão que determinava a porcentagem de inibição previamente estabelecida.

Os soros testados foram diluídos quando necessário, até que a porcentagem de inibição ficasse dentro da curva padrão. Posteriormente, os valores em UI/mL encontrados foram multiplicados pelo fator de diluição para determinação da potência real dos soros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da Pureza da Amostra e Teste de Toxicidade

Na avaliação da pureza da amostra os resultados foram característicos de *Clostridium perfringens*. Após 24 horas de incubação no agar sangue em anaerobiose, houve formação de colônias lisas e brilhantes de cor acizentada com 2-4 mm de diâmetro rodeadas por uma zona de dupla hemólise. Na análise pelo método de Gram o cultivo mostrou-se puro contendo apenas bastonetes Gram positivos. No meio SFP detectou-se colônias negras, característico do crescimento de *C. perfringens*.

Nas provas da fermentação da glicose, maltose e sacarose a amostra foi positiva. No teste de toxicidade observou-se o óbito dos animais dentro das primeiras 24 horas e o grupo controle permaneceu vivo.

4.1.1. Purificação de Toxinas

No presente trabalho, após a cromatografia do cultivo contendo a prototoxina epsilon fez-se o cálculo do gradiente utilizando a fórmula descrita por Work & Work (1975) e os resultados mostraram que o tampão fosfato 0,08 M, no pH 7,2, permitiu que a prototoxina epsilon purificada fosse eluída da coluna de DEAE - Sepharose CL 6B. O ajuste fino da purificação onde o tampão fosfato, com diferentes molaridades no pH 7,2 foi passado individualmente na coluna, possibilitou a padronização da purificação onde a prototoxina epsilon foi eluída com o tampão fosfato 0,01 M no pH 7,2. A purificação permitiu obter no primeiro pico da cromatografia (Figura 2) a prototoxina epsilon purificada, conforme descrito também por El Idrissi & Ward (1992a, 1992b) e Uzal et al. (1997).

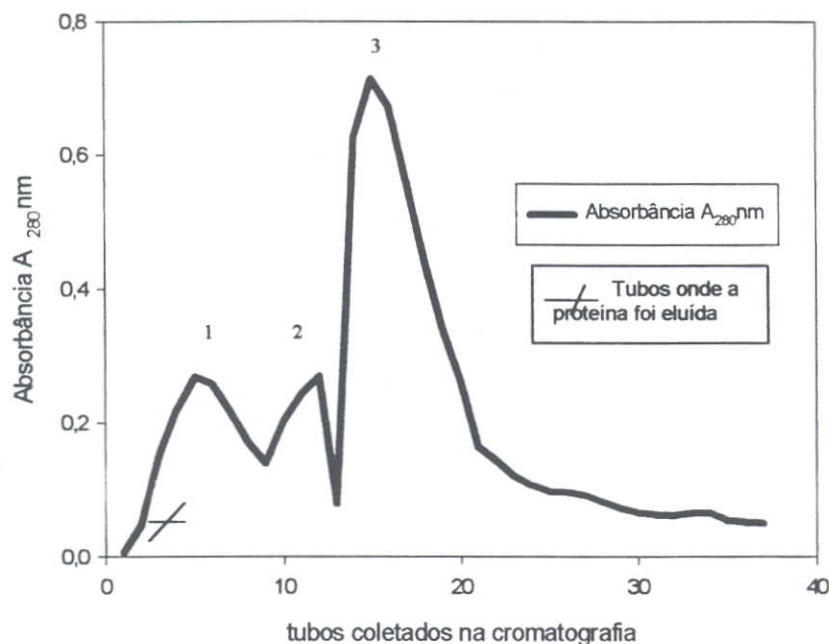


Figura 2: Perfil cromatográfico da purificação da prototoxina epsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D com os picos 1, 2 e 3.

Uzal et al. (1997) trabalharam com duas colunas DEAE Sepharose CL 6B e uma coluna Sephadex G25, ambas equilibradas com Tris a 0,01 M, pH 7,5. Da primeira cromatografia, o eluato do primeiro pico que continha a prototoxina epsilon foi dialisado e liofilizado. A toxina liofilizada foi dissolvida no Tris 0,01M pH 7,5 e passada na segunda coluna. O primeiro pico da segunda cromatografia após dialisado, liofilizado e suspenso em água, foi passado na coluna Sephadex G25. Petit et al. (1997) obtiveram a prototoxina epsilon purificada através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sephadex CL 6B equilibrada com Tris HCl pH 8,0 a 0,01 M. Em seguida, passou-se na coluna NaCl 1M e o material eluído foi dialisado contra o mesmo Tris pH 7,5 e passado novamente na coluna.

Neste trabalho a purificação da prototoxina epsilon, produzida por *C. perfringens* tipo D, através da precipitação com sulfato de amônio seguida pela cromatografia em coluna de troca iônica DEAE - Sepharose

CL 6B resultou em uma preparação contendo proteína purificada a partir de uma metodologia mais rápida e simples além de não requerer equipamento de alto custo, viabilizando economicamente que a técnica seja aplicada em laboratórios com poucos recursos financeiros.

4.1.2. Eletroforese

A prototoxina epsilon não purificada, precipitada pelo sulfato de amônio e após a purificação cromatográfica, quando analisada pela eletroforese, apresentou padrão de peso molecular correspondente a 34299 daltons. O peso molecular da prototoxina epsilon foi estimado em 23200 a 25000 daltons por Habeed (1975), valor inferior a 38000 e 40000 descrito por Orleans et al. (1960) e Thomson (1963) respectivamente (Habeed, 1975). Sakurai et al. (1997) relata o peso molecular da prototoxina epsilon como sendo de 31402 daltons corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A figura 3, mostra em A, gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pelo azul de comassie e em B corado pela prata. Os géis mostram bandas de pesos moleculares correspondentes às proteínas do meio de cultura, sendo diferentes lotes de produção de prototoxina epsilon, e

dentre elas está a banda da prototoxina epsilon. A seta indica a banda correspondente à prototoxina epsilon, com 34299 daltons. As canaletas de um a seis, com diferentes lotes de produção de prototoxina epsilon, mostra que o perfil de produção protéica permaneceu o mesmo.

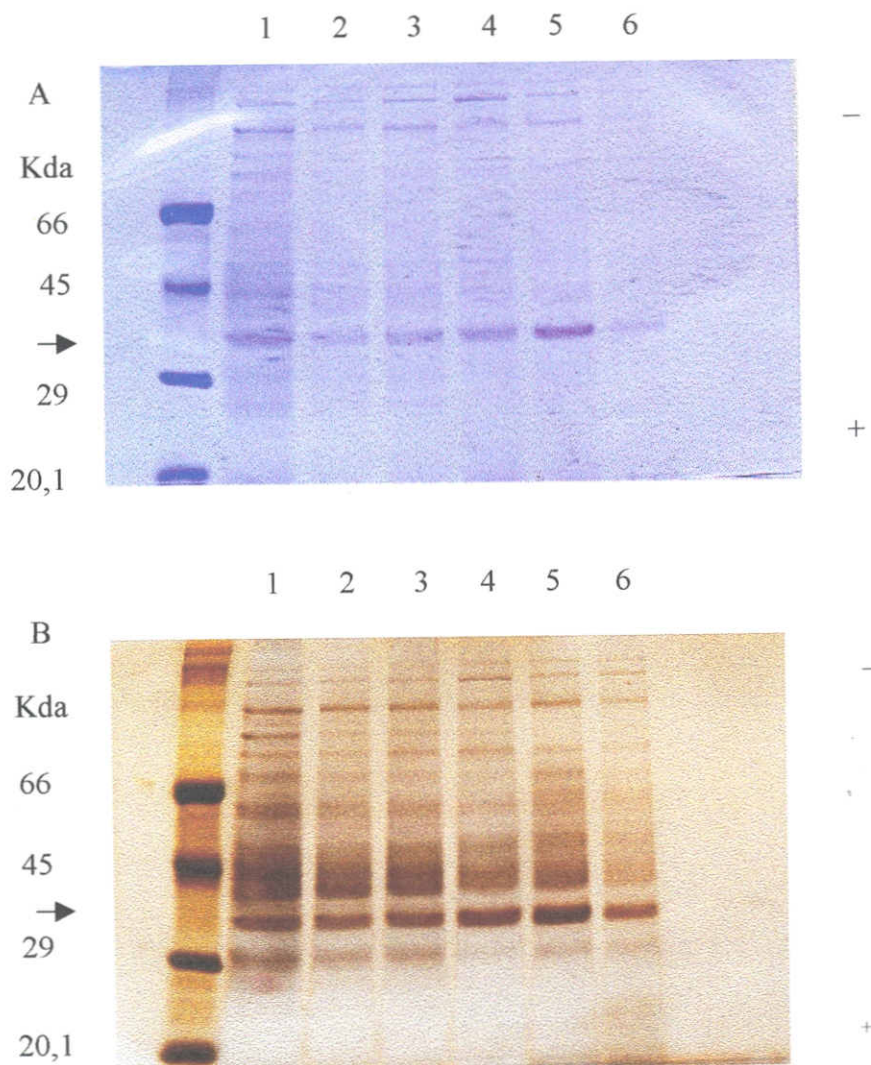


Figura 3: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pelo azul de comassie (A) e prata (B), de amostras do cultivo oriundo de diferentes lotes de produção de prototoxina epsilon não purificada.

Na figura 4, tem-se a prototoxina epsilon purificada, obtida no primeiro pico da cromatografia, analisada quanto ao perfil eletroforético. Os conteúdos dos tubos coletados durante a cromatografia e que após analisados individualmente na eletroforese apresentaram-se

contaminados, por exemplo, tubo 10 (Figura 4), foram descartados. A seta indica a prototoxina epsilon purificada. As canaletas de 1 a 10 são alíquotas individuais das frações eluídas no primeiro pico da cromatografia.

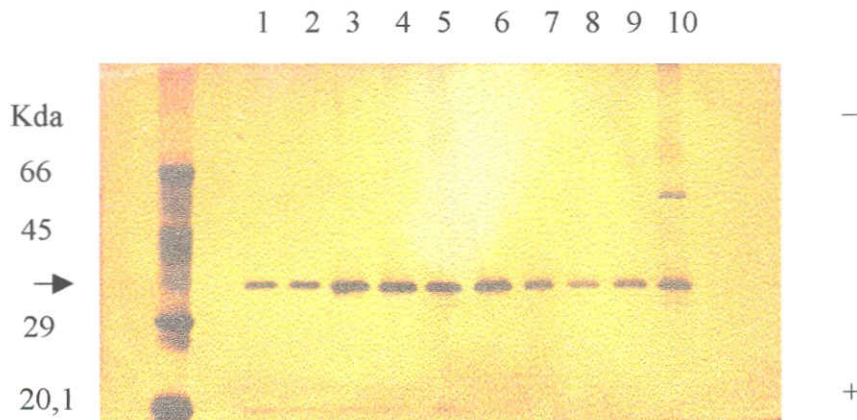


Figura 4: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) da prototoxina epsilon purificada corado pela prata.

4.1.3. Dosagem Protéica

Dos três métodos utilizados para dosagem de proteína, as técnicas de Bradford (1976) e Lowry et al. (1951) foram pouco confiáveis devido à ausência de repetibilidade dos resultados com variação de até 30% entre duas dosagens de proteína de um mesmo material (Tabela 1) e o método de Lowry subestimava a dosagem de proteína em até 50%, quando comparado com o método do coeficiente de extinção.

No métodos Lowry o princípio de desenvolvimento de cor é a redução do reagente de Folin pelos resíduos de tirosina e triptofano presentes na proteína. Como a prototoxina epsilon contém apenas um triptofano (Sakurai et al., 1997) essa seria a razão pela qual esse método subestima a dosagem de proteína da prototoxina epsilon. Fez-se então a opção de trabalhar com o método do coeficiente de extinção por apresentar resultados repetitivos conforme descrito por Worthington et al. (1973).

Tabela 1. Resultados das dosagens de proteína (mg/mL) de uma mesma alíquota da prototoxina epsilon utilizando os métodos de Bradford (1976), Lowry et al. (1951) e coeficiente de extinção (1973)

Métodos utilizados para dosagem protéica	Dosagem 1 (mg/mL)	Dosagem 2 (mg/mL)
Método de Bradford	0,125	0,150
Método de Lowry	0,225	0,283
Método do coeficiente de extinção	0,417	0,416

4.1.4. Destoxificação e Preservação da Prototoxina Epsilon por Iodação Controlada

A prototoxina epsilon contém 296 resíduos de aminoácidos, com a alanina na região N-terminal e a lisina na região C-terminal. Diferentes partidas de prototoxina epsilon purificada podem apresentar três a cinco bandas de proteína, quando analisadas em gel de poliacrilamida. A primeira banda, o componente que se move mais lentamente, apresenta-se como o componente principal, e esta tem sido descrita como a prototoxina

que mais dificilmente é degradada. Worthington et al. (1973) descreveram que uma ou mais bandas da prototoxina epsilon obtidas após purificação cromatográfica desagregam-se quando a proteína está em degradação, como pode ser visualizada no gel de poliacrilamida SDS - PAGE corado pela prata. A figura 5 mostra degradação da prototoxina epsilon purificada, não iodada, com desagregação da banda da proteína. As canaletas de 1 a 7 são alíquotas individuais das frações eluídas no primeiro pico da cromatografia.

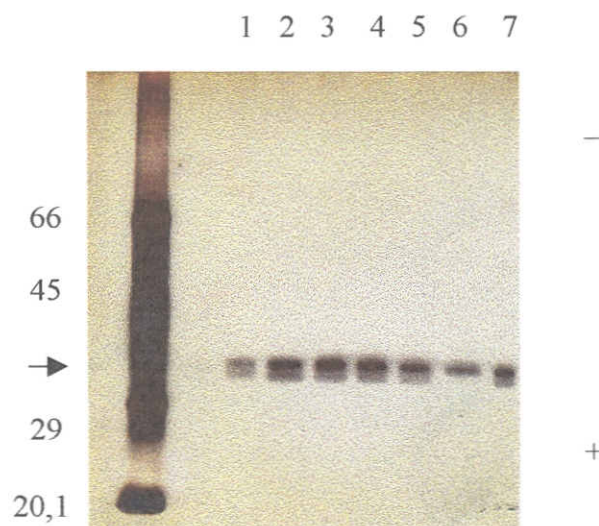


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pela prata.

A causa da degradação da prototoxina epsilon, produzida por *Clostridium perfringens* tipo D, é pouco conhecida. Existe uma possibilidade de ocorrer devido a contaminação por enzimas proteolíticas ou porque a prototoxina seja naturalmente instável, mas não há suporte científico para esta idéia. De acordo com Worthington et al. (1973), a parte não degradada da prototoxina pode ser facilmente separada

através de cromatografia de troca iônica, mas a degradação continua pois uma purificação absoluta pode não ser atingida.

Na análise da preservação da prototoxina epsilon (Tabela 2), após purificada, não iodada e armazenada a -20°C , a mesma não resistiu a degradação protéica. A parte que permaneceu a -80°C foi degradada em 50% num período de seis meses.

Tabela 2: Análise da preservação da prototoxina epsilon não iodada e iodada, quando submetida às temperaturas de -20°C e -80°C por um período de seis meses

Prototoxina	Temperatura de armazenamento	
	-20°C	-80°C
não iodada	(-)	(-50%) 6 meses
iodada	(±)	(+) 6 meses

A prototoxina epsilon purificada, porém iodada, mantida a -20°C apresentou-se ainda instável quanto a degradação. Aquela iodada e mantida a -80°C permaneceu totalmente conservada por seis meses, período até então estudado neste trabalho, porém com o inconveniente de não tolerar vários choques térmicos de descongelamento. Por isso o material foi

aliquotado em pequenos volumes e quando do uso, fez-se descongelamento lento passando de -80°C para -20°C por 30 minutos e então seguiu-se o descongelamento total.

A prototoxina epsilon purificada iodada foi analisada pela eletroforese após seis meses de armazenamento a -80°C (Figura 6) e mostrou estabilidade. Permaneceu íntegra no perfil eletroforético e manteve a mesma dosagem protéica. Na figura 6 a seta mostra a prototoxina epsilon purificada em coluna de troca iônica e destoxificada por iodação controlada após armazenamento de 6 meses a -80°C . Nas canaletas 1 e 2 observa-se que a banda da prototoxina epsilon não sofreu degradação.

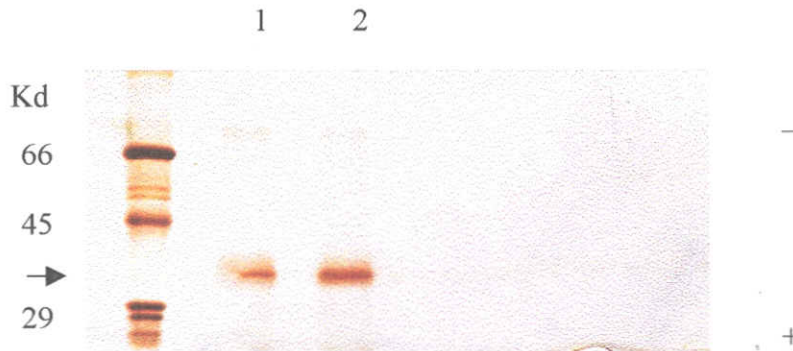


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) corado pela prata.

A iodação controlada da prototoxina epsilon reduziu consideravelmente a degradação protéica e promoveu a destoxificação da toxina, que ao teste de toxicidade mostrou-se incapaz de induzir morte aos animais utilizados, estando de acordo com o descrito por Heneine & Heneine (1998).

4.1.5. Avaliação da Especificidade da Imunoglobulina de Coelho

A figura 7 mostra que no teste não houve reação cruzada com a toxina alfa podendo-

se inferir que a imunoglobulina anti-epsilon produzida em coelho foi específica ligando-se somente a prototoxina epsilon adsorvida na placa. Assim, quando um soro submetido à teste apresentou títulos no ELISA competitivo, significou que o mesmo continha anticorpos anti-epsilon bastante específicos e em quantidade suficiente ao ponto de promover inibição na reação entre a imunoglobulina de coelho e a prototoxina adsorvida na placa.

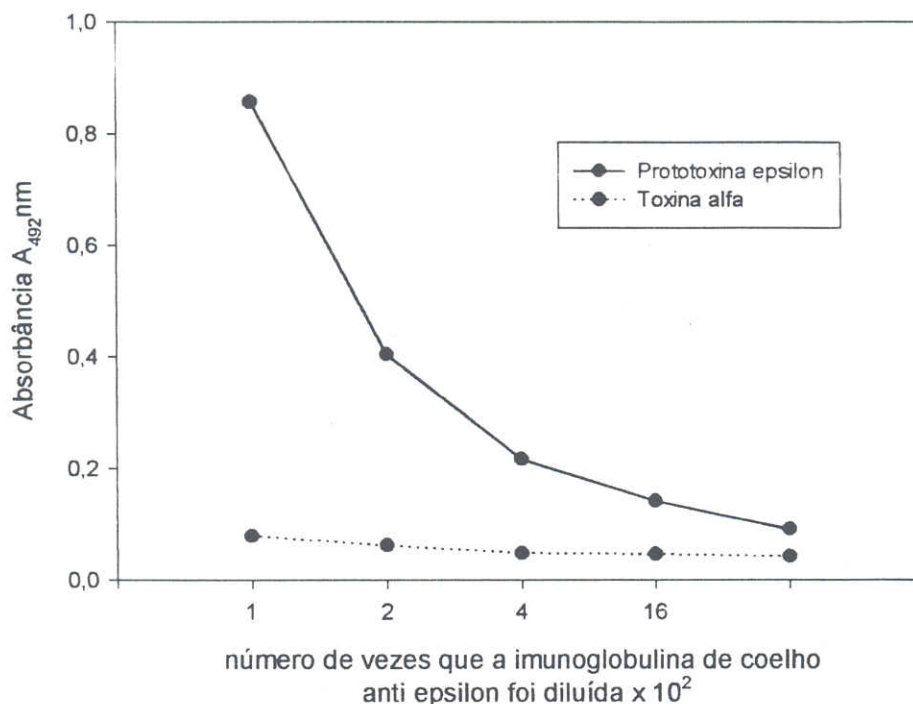


Figura 7: Curva da imunoglobulina anti-epsilon produzida em coelho, nas diluições de 1:100 a 1:1600, com a toxina alfa e prototoxina epsilon adsorvidas na placa.

4.2. ELISA Competitivo para Detecção de Antitoxina Epsilon

Os benefícios de substituir a soroneutralização pelo ELISA são significantes e incluem a redução substancial do uso de animais nos testes (Weddell & Worthington, 1984; Martin et al., 1988) sendo portanto ético e economicamente importante tanto para o diagnóstico de enterotoxemia, como descrito por El Idrissi & Ward (1992a, 1992b), Nagahama et al. (1991) e Naylor et al. (1987), como para o teste de potência de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo D (Wood, 1991). Além disso, o resultado é rápido, aproximadamente três horas, ao contrário de três a quatro dias necessários quando o teste é realizado *in vivo*. Alguns pesquisadores vêm padronizando o ELISA para testar potência de vacinas contra C.

perfringens tipo D utilizando anticorpos monoclonais e policlonais.

4.2.1. Padronização da Técnica

Padronizou-se a técnica do ELISA competitivo, para teste de potência de vacinas, através da titulação em bloco. As placas de poliestireno são as mais freqüentemente utilizadas para a imobilização de antígenos, porém apresentam como desvantagem que sua capacidade absorptiva pode variar entre distintos lotes de placas de um mesmo fabricante (Levings et al., 1993) por isso todos os testes do experimento foram realizados com o mesmo lote de placas de um mesmo fabricante.

A concentração de 2µg/mL de prototoxina epsilon iodada, mostrou ser suficiente para

sensibilizar as placas e a imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase foi utilizada na diluição 1:30000, recomendada pelo fabricante.

A imunoglobulina de coelho (16,66 mg/mL) foi ensaiada nas diluições de 1:200 a 1:102400 (Figura 8). A diluição escolhida

para ser utilizada no ELISA foi aquela que apresentou absorvância igual a 1 a 492nm, pois localiza-se na faixa linear da curva. Determinou-se matematicamente que tal leitura espectrofotométrica ocorreu quando a imunoglobulina de coelho foi diluída 900 vezes.

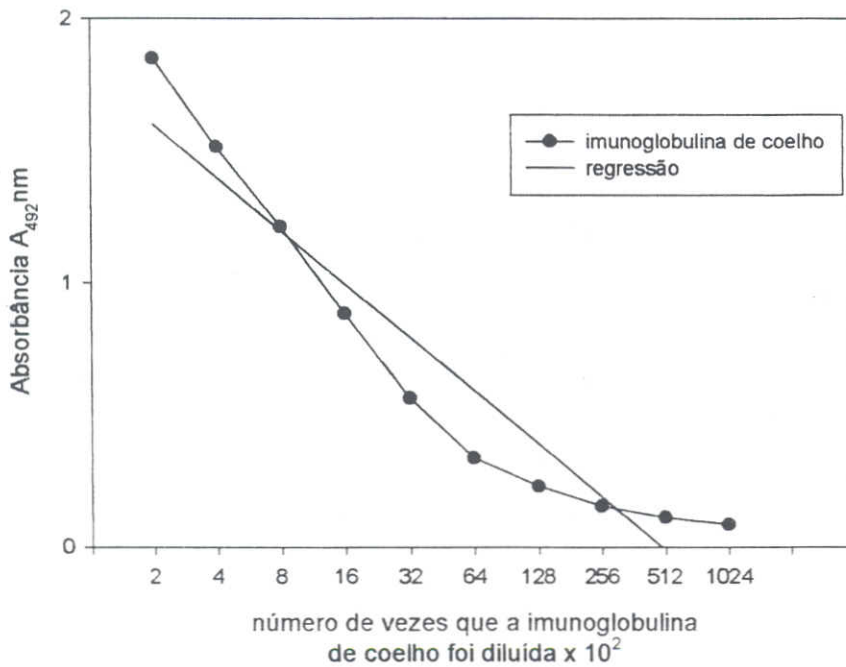


Figura 8: Curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho, nas diluições de 1:200 a 1:102400.

4.2.2. Elaboração da Curva Padrão

Nas placas sensibilizadas com a prototoxina epsilon purificada e iodada, na concentração de 2µg/mL, adicionadas de antitoxina padrão nas concentrações de 5,100, 2,550, 0,213, 0,053, 0,027 UI/mL e imunoglobulina de coelho diluída 450 vezes observou-se que quanto maior a concentração da antitoxina padrão, maior foi

a competição pela prototoxina adsorvida na placa implicando em menor absorvância a 492 nm, pois o princípio para a elaboração da curva padrão baseou-se na inibição da reação entre a imunoglobulina de coelho e a prototoxina epsilon adsorvida na placa de ELISA, pela adição da antitoxina padrão. Utilizou-se a porcentagem de inibição para cálculo do título de antissoros, pois as leituras de absorvância a 492 nm que dão

origem a porcentagem de inibição podem variar e a porcentagem de inibição atenua as diferenças entre os ensaios.

Na elaboração da curva padrão para o teste de potência de vacinas foi feita transformação logarítmica (Ln) dos títulos da antitoxina (Tabela 3) recurso também utilizado por Uzal et al. (1997; 1998) no intuito de linearizar a curva. A tabela 3 mostra que a partir da porcentagem de inibição, média de oito placas, pode-se determinar o título dos soros testados. Quando um soro avaliado apresentar porcentagem de inibição acima de 95,05% apresentará título superior a 5,100 UI/mL se abaixo de 13% de inibição o título será inferior a 0,027 UI/mL. Se a porcentagem de inibição for superior a 100% deve-se diluir o soro até que os valores se encaixem na curva padrão.

Tabela 3: Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos valores em logaritmo neperiano (Ln) e a média da porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo

Antitoxina padrão (UI/mL)	Ln	% de inibição ELISA
5,100	1,630	95,05
2,550	0,940	87,26
0,213	-1,549	48,89
0,053	-2,935	26,24
0,027	-3,628	13,00

A figura 9 mostra a curva padrão e o coeficiente de correlação entre os valores da porcentagem de inibição do ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão de 0,98, resultado igual ao encontrado por Uzal et al. (1997) e superior a 0,96 encontrado por Sojka et al. (1989). O coeficiente de correlação elevado permite maior segurança em concluir que o aumento da porcentagem de inibição corresponde a uma maior concentração de antitoxina epsilon.

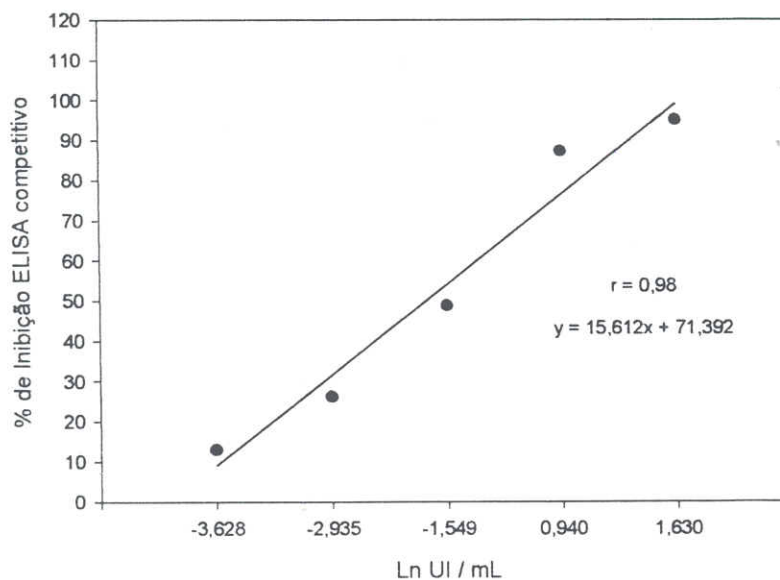


Figura 9: Curva padrão que ilustra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidas no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.

4.2.3. Controle do Teste

4.2.3.1. Seleção dos Pontos da Curva Padrão

Com o intuito de verificar a confiabilidade da curva padrão, utilizou-se a antitoxina padrão, com títulos previamente estabelecidos pela soroneutralização em camundongos e os calculou pelo ELISA selecionando primeiramente três pontos da curva.

As porcentagens de inibição de 95,05, 87,26 e 81,90 (Tabela 4) apresentaram satisfatórias para a elaboração da curva padrão (Figura 10). A seleção de pontos da porcentagem de inibição maiores, menores ou intermediários para a elaboração da

curva também foi utilizada por Sokja et al. (1989) que a elaboraram inicialmente com cinco pontos diferentes de porcentagem de inibição, correspondentes as concentrações entre 0,625 e 20 UI/mL e utilizaram apenas três, 2,5, 5,0 e 10,0 UI/mL, para calcular a potência dos soros.

Tabela 4: Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos valores em logaritmo neperiano (Ln) e porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo

Antitoxina padrão (UI/mL)	Ln	% de inibição
5,100	1,63	95,05
2,550	0,94	87,26
1,275	0,24	81,90

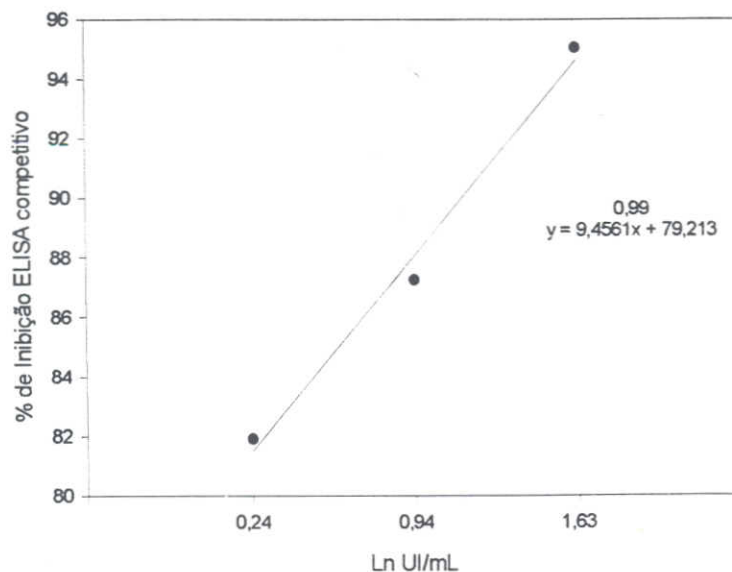


Figura 10: Curva padrão que ilustra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidas no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.

4.2.3.2. Avaliação da Repetibilidade do Teste de ELISA Competitivo

As concentrações (UI/mL) do soro padrão com os respectivos coeficientes de variação intra e interplacas das porcentagens de inibição dos pontos da curva padrão selecionados, estão apresentados na tabela 5. Foram utilizadas oito placas para o cálculo da variação interplaca e três orifícios para o cálculo intraplaca. O coeficiente de variação interplaca ficou entre 1,3 a 5,2 e intraplaca foi menor, sendo de 0,6 a 2,8. Esses valores aumentam a medida que as concentrações da antitoxina padrão diminuem, pois o aumento da diluição aumenta a probabilidade de erro. Neste trabalho a pequena variação do desvio padrão apresentou-se satisfatório pois implica que o teste foi uniforme com pouca discrepância entre os resultados.

Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Sojka et al. (1989), que utilizaram nove placas para calcular a variação interplacas e também três orifícios para a variação intraplaca, onde o

coeficiente de variação intraplaca ficou entre 0,3 a 1,9 enquanto que interplaca entre 2,6 a 6,7 e a variação também aumentou com o decréscimo da concentração da antitoxina padrão.

De acordo com a Pharmacopoeia Europeia (1998), para que uma vacina contra *Clostridium perfringens* tipo D seja considerada satisfatória o título de anticorpos induzidos em coelhos imunizados devem ser de no mínimo 5 UI/mL pela soroneutralização em camundongos. Na concentração de 5,1 UI/mL (Tabela 5) o coeficiente de variação pequeno permite maior confiabilidade a testes sorológicos para resultados iguais ou superiores a 5,1 UI/mL.

O ELISA competitivo padronizado neste experimento não permitiu titular soro de coelho pois a leitura da absorbância foi determinada por um conjugado antioelho, mas o princípio do método poderá ser utilizado para padronizar a técnica e testar soros de diferentes espécies animais.

Tabela 5: Concentração da antitoxina padrão (UI/mL) obtidas pela soroneutralização (SN) e média, desvio padrão (\bar{s}) e coeficiente de variação (CV) dos resultados da porcentagem de inibição obtidas pelo ELISA

Concentração da antitoxina padrão (UI/mL)	ELISA competitivo			
	Intraplaca ¹		Interplaca ²	
	média \pm \bar{s}	CV %	média \pm \bar{s}	CV %
5,100	96,48 \pm 0,67	0.6	95,05 \pm 1,27	1.3
2,550	90,36 \pm 2,07	2.2	87,25 \pm 4,21	4.8
1,275	80,61 \pm 2,28	2.8	81,90 \pm 4,29	5.2

1- Porcentagem de inibição: média de 3 orifícios

2- Porcentagem de inibição: média de 8 placas

4.2.3.3. Titulação da Antitoxina Padrão pelo ELISA Competitivo

Tendo padronizado a curva para cálculo da potência de soros pelo ELISA competitivo, utilizou-se para controle do teste a antitoxina padrão, nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 UI/mL cuja potência foi calculada pelo ELISA e os resultados obtidos foram

correlacionados com os resultados esperados.

A tabela 6 mostra os valores em UI/mL da antitoxina padrão calculados pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo utilizando a curva cujos pontos foram anteriormente selecionados. Os títulos estimados por ambos os testes

foram similares, com coeficiente de correlação entre eles de 0,99 (Figura 11). Esses resultados são satisfatórios e tendem a garantir a eficiência da curva padronizada neste trabalho de maneira que a partir da porcentagem de inibição pode-se determinar com maior segurança os títulos dos antissoros testados.

Tabela 6: Antitoxina epsilon padrão calculada pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo

UI/mL soroneutralização	UI/mL ELISA
1,0	2,1
2,0	2,8
5,0	4,7
10,0	8,0

Sojka et al. (1989) e Wood (1991) obtiveram um coeficiente de correlação entre o ELISA,

competitivo e indireto respectivamente, e a soroneutralização em camundongos de 0,93 enquanto Uzal et al. (1997) obtiveram um resultado de 0,98 utilizando o ELISA competitivo. A razão desta diferença pode ser que enquanto Sojka et al. (1989) utilizaram toxóide não purificado e Wood (1991) utilizou a prototoxina purificada, Uzal et al. (1997) utilizaram a toxina ativada após purificada, o que pode ter aumentado a sensibilidade e especificidade do teste. Neste trabalho utilizou-se a prototoxina epsilon iodada e obteve-se bom coeficiente de correlação, semelhante aos resultados encontrados por Uzal et al. (1997) e Wood (1991) com a vantagem de que a iodação controlada é uma técnica de fácil realização, rápida, reduz degradação da proteína quando adsorvida na placa, viabilizando a realização do método, e não interfere no sítio de ligação entre o antígeno e o anticorpo.

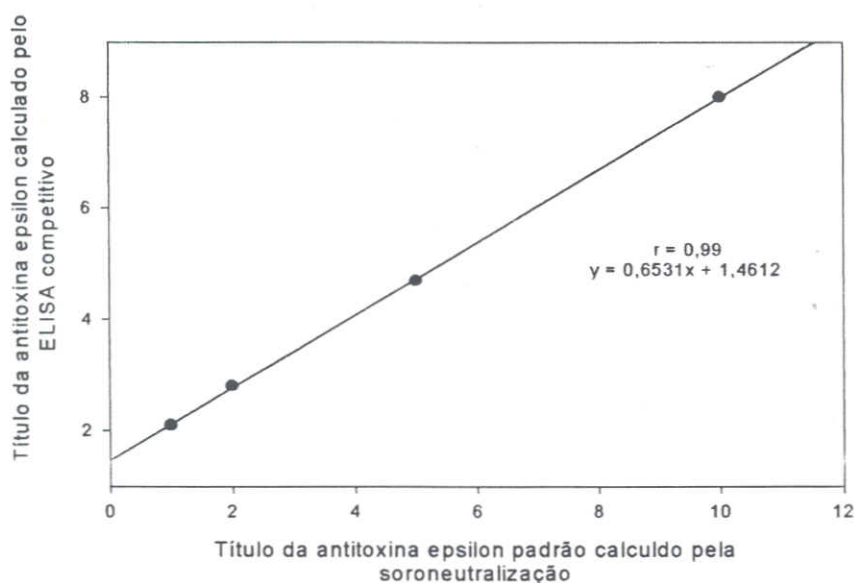


Figura 11: Correlação entre os títulos da antitoxina epsilon padrão obtidos pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo.

Wood (1991) trabalhou com os anticorpos policlonais e o coeficiente de correlação dos resultados entre os títulos mensurados através da soroneutralização em camundongos foi satisfatório. O alto coeficiente de correlação encontrado nesse trabalho sugere que entidades similares são mensuradas em ambos os testes corroborando com os resultados encontrados por Sojka et al. (1989) e Uzal et al. (1997).

4.2.4. Verificação da Aplicação do Teste ELISA Competitivo

Foram utilizados os soros hiperimunes dos carneiros para verificar a aplicação do teste, a partir de uma curva previamente elaborada.

Os títulos dos soros dos carneiros nomeados a, b e c (Tabela 7) foram calculados a partir da curva padrão da respectiva placa do teste e a partir da curva padrão com as porcentagens de inibição 95,05, 87,26 e 81,90 (Figura 10). O coeficiente de correlação entre esses resultados foi de 0,94 (Figura 12) e implica que a curva padrão previamente elaborada poderá ser utilizada para titular soros testados em placas diferentes, viabilizando a aplicação do método. Porém, isso não elimina a necessidade de que em todos os ensaios sejam feitos controles negativos e positivos para garantir a qualidade dos reagentes e a eficiência do operador.

Tabela 7: Títulos dos soros (UI/mL) dos carneiros a, b e c calculados a partir da curva padrão elaborada na própria placa do teste e calculados pela curva padrão média de várias placas, com seus respectivos coeficientes de variação (CV)

Animal	UI/mL calculado curva da placa	UI/mL calculado na média de várias placas	% de inibição ELISA competitivo	CV %
a1	771,25	1075,00	92,99	1,20
a2	646,40	559,36	93,19	0,70
b1	165,12	131,20	92,47	2,00
b2	33,30	28,00	83,88	0,09
c1	2,67	2,23	80,05	3,30
c2	2,35	2,22	80,11	2,10
c3	1,71	1,69	77,31	4,60

a1 b1 sangria 1 (10 dias após a 4ª imunização)

a2 b2 sangria 2 (10 dias após a dose de reforço)

c1 10 dias após ingestão de colostro

c2 45 dias após ingestão de colostro

c3 55 dias após ingestão de colostro

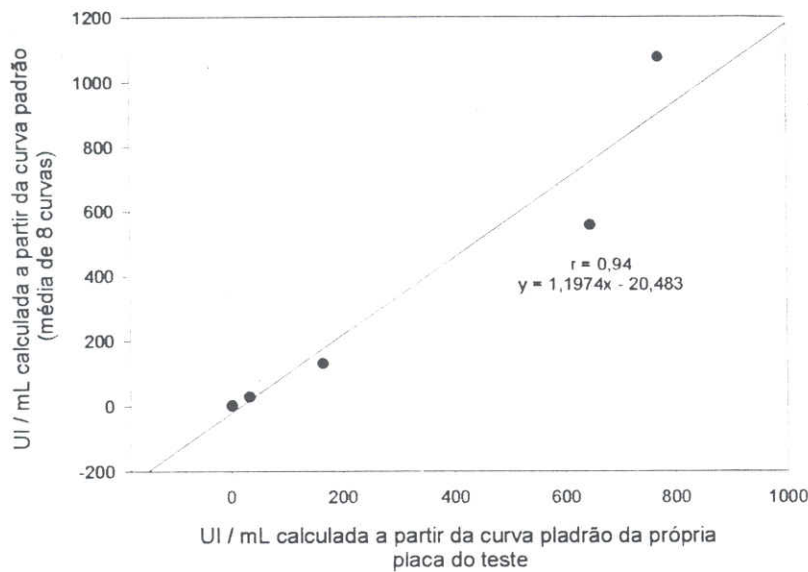


Figura 12: Correlação entre os títulos dos soros dos carneiros calculados através da curva da própria placa do teste e através da curva padrão média de várias placas.

4.2.5. Avaliação dos Soros dos Bovinos

A avaliação dos soros dos bovinos foi feita a partir de um novo lote de prototoxina epsilon iodada e de imunoglobulina de coelho. A padronização da técnica foi feita como

anteriormente descrito nos itens 4.2.1. e 4.2.2. A necessidade de nova padronização (Figura 13) logo que um dos reagentes for trocado foi relatado também por Sokja et al. (1989).

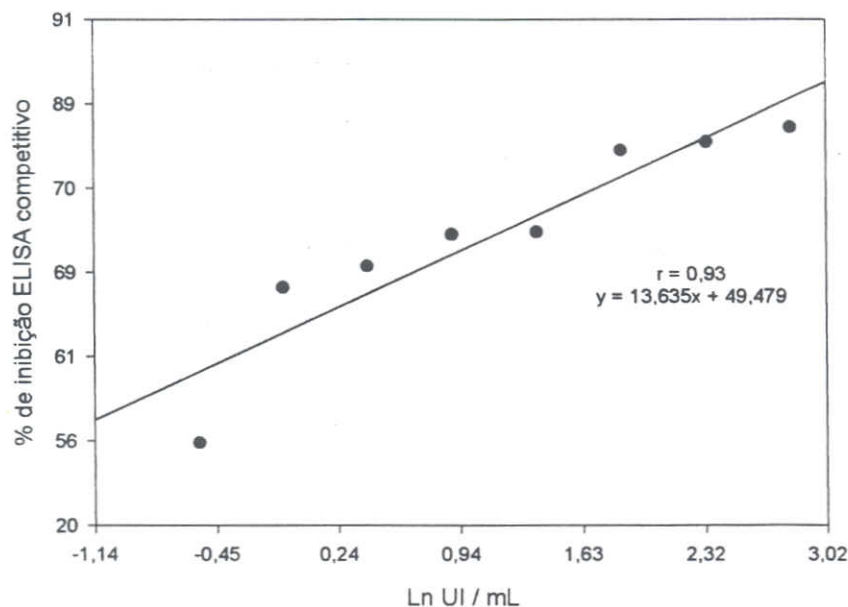


Figura 13: Curva padrão ilustrando a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidos no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina padrão.

A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da prototoxina epsilon iodada mostrou ser suficiente para sensibilização das placas. A imunoglobulina de coelho (0,289 mg/mL) foi utilizada na diluição 1:100 e o conjugado permaneceu como recomendado pelo fabricante diluído 1:30000.

Os valores da porcentagem de inibição e logaritmo neperiano (Ln) dos valores da concentração (UI/mL) da antitoxina padrão estão na tabela 8. Com os novos reagentes padronizados o coeficiente de correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidos no ELISA e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores da concentração (UI/mL) da antitoxina padrão, permaneceu satisfatório sendo de 0,93 (Figura 13), similar a 0,98 e 0,96 relatados respectivamente por Uzal et al. (1997) e Sojka et al. (1989).

Tabela 8: Antitoxina epsilon padrão (UI/mL) com seus respectivos logaritmo neperiano (Ln) e porcentagem de inibição a que correspondem no ELISA competitivo

Antitoxina padrão (UI/mL)	Ln	% de inibição ELISA
40,800	3,71	94,36
20,400	3,02	90,93
10,200	2,32	88,93
5,100	1,63	69,55
2,550	0,94	68,94
1,275	0,24	61,46
0,638	-0,45	56,43
0,319	-0,11	19,30

Os resultados dos testes da soroneutralização em camundongos e do ELISA competitivo, realizados com os 40 soros dos bovinos, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados dos testes de soroneutralização em camundongos e ELISA competitivo, realizados em soros de bovinos vacinados com duas doses de toxóide C e D contra *Clostridium perfringens* tipo D

Testes	Sangria					
	Dia 0		Dia 42		Dia 56	
	T	R	T	R	T	R
SN	40	0	40	5	40	5
ELISA	40	0	40	1	40	5

T - testado SN - soroneutralização
R - reagiu no teste ELISA - ELISA competitivo

Dos 40 soros de bovinos, coletados 42 dias após a primeira imunização, cinco apresentaram título na soroneutralização e um no ELISA. Dos soros dos mesmos animais sangrados no dia 56, correspondente a 14 dias após a segunda imunização, cinco apresentaram títulos em

ambos os testes (Tabela 10). Tanto no ELISA como na soroneutralização os títulos dos soros dos bovinos foram maiores na terceira sangria, 14 dias após a segunda dose da vacina, resultado também observado por Lobato et al. (1999) quando avaliaram através do teste de soroneutralização, soros de bovinos imunizados com toxóide botulínico.

A correlação entre os resultados obtidos no ELISA e os obtidos na soroneutralização foi de 0,86 (Figura 14). Neste trabalho, o soro utilizado para padronizar o ELISA não foi o mesmo utilizado para padronizar a toxina para se fazer o teste *in vivo*. O coeficiente de correlação tende a ser maior quando o mesmo soro é utilizado para padronizar a toxina para o teste da soroneutralização e para padronizar a curva padrão do ELISA (Heneine, comunicação pessoal)¹.

Tabela 10: Níveis de antitoxina epsilon dos soros dos bovinos que apresentaram títulos aos 42 e 56 dias após a primovacinação, pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo

Dia	UI/mL soroneutralização		UI/mL ELISA			
	42	56	42	56	42	56
			% inibição		% inibição	
	0,30	3,60	0,00	0,00	2,20	41,06
	1,40	6,90	0,00	0,00	5,53	74,49
	0,20	2,60	0,00	0,00	3,13	66,85
	1,20	5,60	0,00	0,00	1,78	59,35
	1,30	1,40	0,09	19,65	0,39 ¹	39,02

¹ Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Belo Horizonte - MG

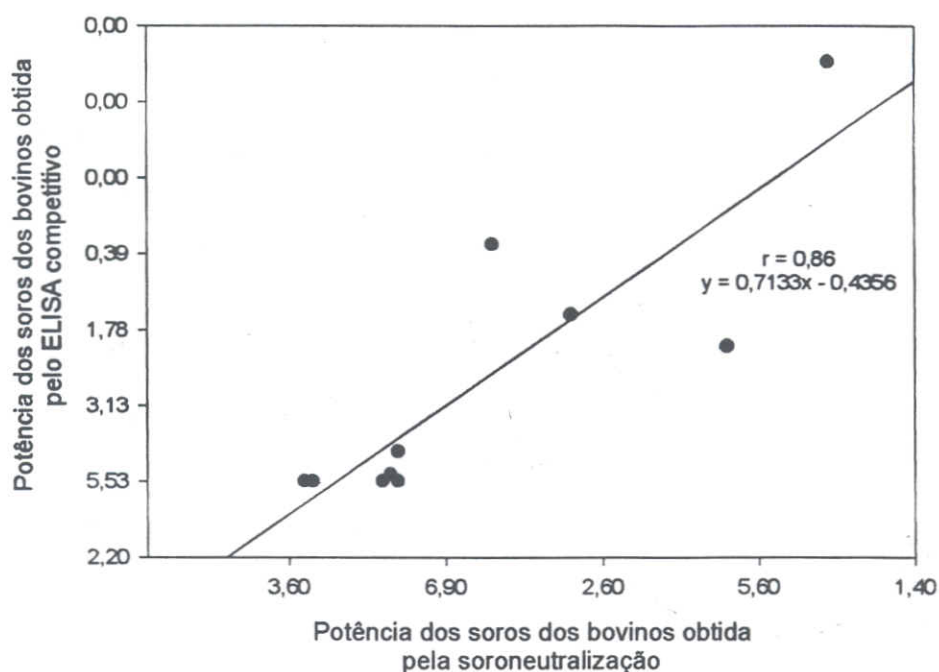


Figura 14: Correlação entre a potência dos soros dos bovinos obtida pela soroneutralização em camundongos e pelo ELISA competitivo.

Uzal et al. (1997) e Sojka et al. (1989) utilizaram anticorpos monoclonais para detecção de imunoglobulina antiepsilon nos soros de cabras e coelhos respectivamente, com coeficiente de correlação satisfatório entre os títulos mensurados através da soroneutralização. Os mesmos autores relatam que o uso de anticorpos monoclonais elimina a necessidade de estocar conjugado contra várias espécies. Sojka et al. (1989) relataram que alguns soros, quando avaliados individualmente no ELISA padronizado com anticorpo monoclonal, não apresentaram títulos ao contrário de quando testavam-se os mesmos soros agrupados. Concluíram que o ELISA assim padronizado foi menos eficiente para testar potência de antissoros pois o animal pode estar imunizado e não apresentar anticorpos para competir com o anticorpo monoclonal utilizado no método. Neste trabalho obteve-se resultados satisfatórios utilizando-se anticorpos policlonais que são mais fáceis de serem obtidos tomando a técnica mais barata e

prática. Sugerindo que a padronização do ELISA sanduíche permitirá titulação de antissoros de diferentes espécies animais utilizando os anticorpos policlonais.

5 CONCLUSÕES

- A utilização da coluna de troca iônica DEAE-Sepharose CL 6B foi satisfatória para a purificação da prototoxina epsilon produzida por *Clostridium perfringens* tipo D.
- O método de iodação controlada foi eficiente para destoxificar e estabilizar a prototoxina epsilon.
- O ELISA competitivo mostrou-se sensível, específico e prático para detectar imunoglobulinas antitoxina epsilon.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, E.O. *Avaliação de vacinas contra Clostridium perfringens tipos C e D*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1997. 57p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório de Referência Animal. Portaria n. 051, 16/07/1994 (comunicado interno)
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, 12 de maio de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- EL IDRISSEI, A.H.; WARD, G.E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Veterinary Microbiology*, v.31, n.1, p.89-99, 1992a.
- EL IDRISSEI, A.H.; WARD, G.E. Evaluation of enzyme - linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary Microbiology*, v.31, p.389-396, 1992b.
- EUROPEAN pharmacopeia. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998. p.363: Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium.
- FRIAS FILHO, O. Bioética: países da OCDE desistem de teste "cruel". *Folha de São Paulo*, 26 dez., 2000. Caderno Folha Ciência, p. A10.
- GRINER, L.A.; AICHELMAN, W.W.; BROWN, G.D. *Clostridium perfringens* type D (epsilon) enterotoxemia in brown swiss dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, P. 375-376, 1956.
- HABEEB, A.F.S.A. Studies on epsilon prototoxin of *Clostridium perfringens* type D physicochemical and chemical properties of epsilon prototoxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.412, p.62-69, 1975.
- HENEINE, I.F.; HENEINE, L.G. Stepwise iodation. A general procedure for dextoxification of proteins suitable for vaccine development and antiserum production. *Biologicals*, v.26, p.25-32, 1998.
- ITOTO, A.E.; AGBA, M.I.; OKEWOLE, P.A. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in cattle. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, Nigeria, v.31, p.193-195, 1983.
- KNIGHT, P.A.; QUEMINET, J.; BLANCHARD, J.H. et al. *In vitro* tests for the measurement of clostridial toxins, toxoids and antisera; titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*, v.18, p.263-270, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- LEVINGS, R.L.; HENDERSON, L.M.; METZ, C.A. *In vitro* potency assays for nonreplicating veterinary vaccines: comparison to *in vivo* assays and considerations in assay development. *Veterinary Microbiology*, p.201-217, 1993.
- LOBATO, F.C.F. *Avaliação de imunógenos anti-botulínicos em uso no Brasil*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1989. 59p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).

- LOBATO, F.C.F.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V.L.V. et al. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.21, n.1, p.25-27, 1999.
- LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O. et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.52, n. 4, p.313-318, 2000.
- LOWRY, O.H.; ROSE-BROUGH, N.J.; FARR, A. et al. Protein measurant with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- MARTIN, P.K.; NAYLOR, R.D.; SHARPE, R.T. Detection of *Clostridium perfringens* β toxin by ELISA. *Research in Veterinary Science*, v.44, p.270-271, 1988.
- NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters*, v.84, p.41-44, 1991.
- NAYLOR, R.D.; MARTIN, P.K.; SHARPE, R. T. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Research in veterinary science*, v.42, p.255-256, 1987.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D. et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *Journal of Bacteriology*, v.179, n. 20, p.6480-6487, 1997.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; OCHI, S. Major Toxins of *Clostridium perfringens*. *Journal of Toxicology*, v.16, n.4, p.195-214, 1997.
- SEBALD, M.; PETIT, J.C. Group identification. In: *Laboratory methods anaerobic bacteria and their identification*. 2 ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p. 189-197.
- SIGURDARSON, S.; THORSTEINSSON, T. Sudden death of icelandic dairy cattle. *The Veterinary Record*, p.410, 1990.
- SILVEIRA, D.; SOUZA, A.M.; MESQUITA, A.J. et al. Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância emergente. *Boletim Técnico Informativo Rhodia-Mérieux*, v.2, n.3, p.1-4, 1995.
- SOJKA, M.G.; WHITE, V.J.; THORNS, C.J. et al. The detection of *Clostridium perfringens* epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody based competition ELISA. *Journal of Biological Standardization*, v.17, p.117-124, 1989.
- TUNON, P.; JOHANSON, K.E. Yet another improved improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, v.9, p.171-179, 1984.
- UZAL, F.A.; NIELSEN K.; KELLY, W.R. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, v.51, p.223-231, 1997.
- UZAL, F.A.; BODERO, D.A.V.; KELLY, W.R. et al. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. *Veterinary Record*, v. 143, p.472-474, 1998.
- WEDDELL, W.; WORTHINGTON, R. W. An enzyme labelled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contents. *New Zealand Veterinary Journal*, Auckland, v.33, p.36-37, 1984.

WOOD, K.R. An alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency testing of 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.

WORTHINGTON, R.W.; MÜLDERS, M.S.G.; VAN RENSBURG, J.J. *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin. Some chemical immunological and biological properties of a highly purified prototoxin. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.40, n.4, p.143-152, 1973.

WORK, T.S.; WORK, E. *Laboratory techniques*. 2 ed. New York: North-Holand, 1975. 400 p.