



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Campus Regional de Montes Claros

Mestrado em Ciências Agrárias
Agroecologia

MÉTODOS *IN VITRO* PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS
CLOSTRIDIAIS

ELIANE MACEDO SOBRINHO

Montes Claros – MG
2008

ELIANE MACEDO SOBRINHO

Métodos *in vitro* para controle de qualidade de vacinas clostridiais

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Anna Christina Almeida

**Montes Claros
2008**

Sobrinho, Eliane Macedo
S677m Métodos *in vitro* para Controle de Qualidade de Vacinas
2008 Clostridiais / Eliane Macedo Sobrinho. Montes Claros, MG:
ICA/UFMG, 2008.
151 f: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de
concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas
Gerais, 2008.

Orientadora: Anna Christina Almeida.

Banca examinadora: Wagner Quintilio, Regynaldo Arruda
Sampaio, Francisco Carlos Faria Lobato.

Inclui bibliografia por capítulo.

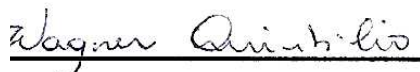
1. Bioética animal. 2. Vacinas - Bioética. 3. Ética - Veterinária. I.
Almeida, Anna Christina. II. Universidade Federal de Minas
Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.09: 179.3

ELIANE MACEDO SOBRINHO

**MÉTODOS *IN VITRO* PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS
CLOSTRIDIAIS**

Aprovada em 2 de julho de 2008.



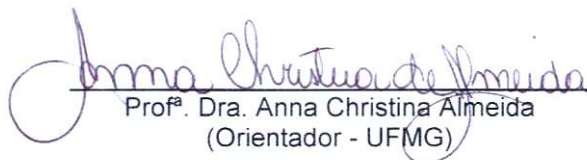
Profº Dr. Wagner Quintilio
(Instituto Butantan)



Profº. Dr. Reginaldo Arruda Sampaio
(UFMG)



Profº. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato
(Co-orientador/UFMG)



Profª. Dra. Anna Christina Almeida
(Orientador - UFMG)

**Montes Claros
2008**

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Fátima, e ao meu noivo, Hércules, que sempre caminharam comigo rumo à vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, a presença incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Anna Christina Almeida, a paciência e a amizade que foram fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

À Vallée S.A. os apoios técnico e financeiro.

Ao Igor Viana Brandi as oportunidades que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

Aos meus co-orientadores, Fernando Colen, Francisco Lobato e Igor Brandi, a partilha de novos conhecimentos.

À Marcelina, à Vanessa e à Isabella a ajuda e o empenho na realização deste trabalho.

À minha família, pais, irmãos e noivo o grande amor que têm dedicado a mim.

Ao meu afilhado e sobrinho, Claudinho, que deu um novo sentido à minha vida.

À Maria Antônia Gomes Santos o exemplo de mulher.

Aos amigos do biotério a amizade e o empenho dispensado à realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, de modo especial ao Alex Sander Cangussu, o grande incentivo na busca de novas conquistas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A questão não é se os animais raciocinam,
nem se eles podem falar, mas, se eles sofrem”

Jeremy Bentham

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho utilizada no teste ELISA, que mostra a correlação entre os valores de absorbância (492 nm) e a concentração de imunoglobulina presente no soro de coelho, bem como a curva de regressão linear da análise e o desvio padrão em cada ponto mensurado. Em (B) estão representadas as mesmas análises que foram realizadas em (A)..... 65
- Figura 2 Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorbância (A_{492nm}) no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL de antitoxina epsilon de soro de coelho..... 67
- Figura 3 Curva padrão que mostra 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 epsilon padrão..... 75
- Figura 4 Relação entre os títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos pelos métodos Soroneutralização e ELISA competitivo nas placas 1, 2, 3 e 4 representados em A, B, C e D respectivamente..... 79

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorbância (A_{492nm}) no ToBI test e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL de antitoxina epsilon em soro de coelho..... 97
- Figura 2 Relação entre os títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) presente em soros de coelhos, imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes contra clostridioses, obtidos pelos métodos de Soroneutralização e ToBI test modificado. Em (A) e (B) estão representados os resultados dos soros de vacinas polivalentes nas placas 1 e 2 respectivamente. Em (C) e (D) estão representados os resultados dos soros de vacinas monovalentes nas placas 1 e 2 respectivamente..... 103
- Figura 3 Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidos no ToBI test modificado e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em 105

	UI/mL da antitoxina padrão.....	
Figura 4	Relação entre os títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) presente em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos pelos métodos de Soroneutralização e ToBI test modificado na placa 1, 2, 3 e 4 representados em A, B, C e D respectivamente.....	109

CAPÍTULO 4

Figura 1	Curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho utilizada no teste ELISA direto modificado, que mostra a correlação entre os valores de absorbância (492 nm) e a concentração de imunoglobulina presente no soro de coelho, bem como a curva de regressão linear da análise e o desvio padrão em cada ponto mensurado.....	124
Figura 2	Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorbância (A_{492nm}) no ToBI test e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores, em TCP/mL, de toxóide epsilon.....	126
Figura 3	Relação entre os títulos de toxóide epsilon (Ln TCP/mL), obtidos pelos métodos TCP <i>in vivo</i> e ToBI test modificado nas placas 1, 2 e 3, representadas em A, B e C respectivamente.....	131

CAPÍTULO 5

Figura 1	Curva que mostra a Linearidade da técnica limite de floculação em diluições seriadas.....	145
Figura 2	Curva que representa a correlação entre os títulos de toxóide obtidos por TCP e Limite de floculação.....	146

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- 1 Composição antigênica das vacinas clostridiais polivalentes, utilizadas na avaliação das metodologias *in vitro* e *in vivo*, destinadas à análise de soro de animais imunizados..... 53
- 2 Esquema de imunização de carneiros com toxóide e toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D..... 56
- 3 Títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) em logaritmo neperiano, em soros de coelhos imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes, pelo método ELISA competitivo nas placas 1 e 2. 68
- 4 Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina de coelho, presentes em soros de coelhos, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes..... 70
- 5 Porcentagem de inibição do teste ELISA competitivo com respectivos valores de antitoxina epsilon em logaritmo neperiano (Ln UI/mL), valores de absorbância obtidos das placas 1, 2, 3 e 4 e desvio padrão em cada ponto mensurado.... 76
- 6 Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes..... 81

CAPÍTULO 3

- 1 Títulos de antitoxina epsilon (UI/mL) em logaritmo neperiano, presentes em soros de coelho imunizados com vacinas polivalentes, pelo método de ToBI test modificado nas placas 1 e 2 e o desvio padrão em cada ponto mensurado..... 99
- 2 Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de coelhos imunizados, com vacinas contra clostridioses obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes..... 101
- 3 Porcentagem de inibição do ToBI test modificado com respectivos valores de antitoxina epsilon em logaritmo neperiano (Ln UI/mL) e valores de absorbância obtidos das placas 1, 2, 3 e 4 e o desvio padrão em cada ponto mensurado.. 107

4	Coefficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de carneiros imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes.....	110
---	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPÍTULO 4

1	Títulos de toxóide epsilon padrão NIBSC em diluições seriadas (1:4 a 1:65536), obtidos pela metodologia <i>in vivo</i> TCP, e o valor correspondente em logaritmo neperiano.....	123
2	Títulos de toxóide epsilon (TCP/mL) em logaritmo neperiano, pelo método de ToBI test, nas placas 1, 2 e 3, com os respectivos valores de absorbância e o desvio padrão em cada ponto mensurado.....	128

CAPÍTULO 5

1	Títulos de antitoxina epsilon, nos soros de coelhos e carneiros imunizados, obtidos por soroneutralização em camundongo.....	141
2	Títulos de toxóide epsilon padrão NIBSC, em diluições seriadas, obtidos por meio do método <i>in vitro</i> Limite de floculação.....	144
3	Títulos médios de toxóide epsilon dos lotes 532/08, 551/08, 375/07, 373/07, 378/07, obtidos por meio do método Limite de floculação e a relação entre resultados obtidos por meio dos métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	147

LISTA DE SIGLAS

+/10	Limite de morte: menor quantidade de toxina que frente a 0,1 UI mata pelo menos 80% dos camundongos inoculados
CFR	Code Federal Regulation
DL ₅₀	Dose capaz de matar 50% de uma população em determinado período de tempo
dT	Vacina contra difteria e tétano
DTP	Vacina contra difteria, tétano e pertussis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EUA	Unidade de antitoxina obtida pelo ELISA
L0/10	Limite de vida: maior quantidade de toxina que frente a 0,1 UI não causa morte ou doença nos animais inoculados
Lf	Limite de floculação
Ln	Logarítmo neperiano
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
OPD	Orto-fenilenodiamino
TCP	Total Combining Power
ToBI	Toxin Binding Inibition
UA	Unidade de antitoxina
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	<i>Clostridium perfringens</i> tipo D e a Enterotoxemia.....	19
2.2	Vacinas Clostridiais.....	22
2.3	Controle de Qualidade de Vacinas.....	24
2.3.1	Testes <i>in vivo</i>	24
2.3.1.1	Teste convencional – Soroneutralização.....	24
2.3.1.2	TCP – <i>Total Combining Power</i>	25
2.3.2	Testes <i>in vitro</i>	26
2.3.2.1	ELISA - <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	26
2.3.2.2	ToBI test - <i>Toxin Binding inhibition test</i>	31
2.3.2.3	Limite de Floclulação (Lf).....	34
2.4	Utilização de Animais em Experimentos de Pesquisa.....	36
3	OBJETIVOS.....	40
4	REFERÊNCIAS.....	41
	CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SORONEUTRALIZAÇÃO EM CAMUNDONGO E ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTITOXINA EPSILON EM SOROS DE ANIMAIS IMUNIZADOS.....	49
	RESUMO.....	49
	ABSTRACT.....	50
1	INTRODUÇÃO.....	51
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1	Imunização de animais para a produção de soros.....	55

2.2	Teste de soroneutralização em camundongo.....	57
2.3	Titulação de antitoxina epsilon, presente no soro teste de coelhos e carneiros, imunizados contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, por meio do método <i>in vitro</i> – ELISA Competitivo modificado.....	57
2.3.1	Procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho anti-epsilon toxina e de conjugado anti-soro de coelho, utilizados no teste ELISA competitivo.....	58
2.3.2	Elaboração da Curva Padrão para o teste de ELISA competitivo para análise de soro de coelho imunizado.....	59
2.3.3	ELISA competitivo, utilizando soro de coelho imunizado.....	59
2.3.4	Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo para a análise de soro de carneiro imunizado.....	60
2.3.5	ELISA competitivo, utilizando soro de carneiro imunizado.....	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1	Titulação de antitoxina epsilon, em soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, por meio dos métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62
3.1.1	Padronização de antígeno, anticorpo de coelho e conjugado anti-soro de coelho utilizados no teste ELISA competitivo.....	64
3.1.2	Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo para titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de coelhos imunizados.....	66
3.1.3	Verificação da aplicação do teste ELISA Competitivo, avaliando-se soros de coelhos imunizados com vacinas anti clostridiose.....	67
3.1.3.1	Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho, obtidos pelos métodos ELISA e soroneutralização em camundongo.....	71
3.1.4	Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo utilizando soro de carneiro.....	74
3.1.5	Verificação da aplicação do teste ELISA competitivo, avaliando-se soros de carneiros imunizados com vacinas anti clostridiose.....	75
3.1.5.1	Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em	

	soro de carneiro, obtidos pelos métodos ELISA e soroneutralização em camundongo.....	78
4	CONCLUSÃO.....	83
5	REFERÊNCIAS.....	84
	CAPÍTULO 3 – QUANTIFICAÇÃO DE ANTITOXINA EPSILON EM SORO DE ANIMAIS, IMUNIZADOS, UTILIZANDO ToBI (Toxin binding inhibition) TEST MODIFICADO.....	87
	RESUMO.....	87
	ABSTRACT.....	88
1	INTRODUÇÃO.....	89
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1	Reagentes utilizados na realização do ToBI test para o controle de qualidade de vacinas clostridiais.....	91
2.2	Titulação de antitoxina epsilon em soro teste de coelhos e carneiros, imunizados contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, pelo método <i>in vitro</i> – ToBI test modificado.....	91
2.2.1	Procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho e de conjugado anti-soro de coelho utilizados no ToBI test modificado.....	92
2.2.2	Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test para análise de soro de coelho imunizado.....	93
2.2.3	ToBI test modificado, utilizando soro de coelho imunizado.....	93
2.2.4	Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test para a análise de soro de carneiro imunizado.....	94
2.2.5	ToBI test modificado utilizando soro de carneiro imunizado.....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
3.1	Titulação de antitoxina epsilon em soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, pelo método <i>in vitro</i> – ToBI test modificado.....	96
3.1.1	Procedimento de padronização de antígeno, anticorpo de coelho e conjugado anti-soro de coelho utilizados no ToBI test modificado.....	96

3.1.2	Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para análise de soro de coelho.....	96
3.1.3	Verificação da aplicação do ToBI test modificado, avaliando-se soros de coelhos imunizados com vacinas anti- clostridiose	98
3.1.3.1	Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho, obtidos pelos métodos ToBI test modificado e soroneutralização em camundongo.....	102
3.1.4	Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para a análise de soro de carneiro.....	104
3.1.5	Verificação da aplicação do ToBI test modificado, avaliando-se soros de carneiros imunizados com vacinas anti clostridiose.....	106
3.1.5.1	Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de carneiro, obtidos pelos métodos de ToBI test modificado e soroneutralização em camundongo.....	108
4	CONCLUSÃO.....	112
5	REFERÊNCIAS.....	113
	CAPÍTULO 4 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS <i>IN VITRO</i>, ELISA E ToBI(<i>TOXIN BINDING INIBIHITION</i>) TEST MODIFICADO, COM A METODOLOGIA <i>IN VIVO</i> TCP (<i>TOTAL COMBINNING POWER</i>) PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE PROCESSOS DE VACINAS CLOSTRIDIAIS.....	115
	RESUMO.....	115
	ABSTRACT.....	116
1	INTRODUÇÃO.....	117
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	119
2.1	Reagentes utilizados na realização do ELISA direto modificado e ToBI test modificado para o controle de qualidade do processo de vacinas anti-epsilon.....	119
2.2	ELISA direto modificado para a avaliação de toxóide epsilon...	119
2.3	ToBI test modificado para a avaliação de toxóide epsilon.....	120
2.4	TCP (<i>Total Combining Power</i>).....	121

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
	Avaliação do toxóide epsilon pelos métodos <i>in vitro</i> ; ELISA direto modificado e ToBI test modificado, e o método <i>in vivo</i> TCP.....	122
3.1	TCP.....	122
3.1.1	TCP (<i>Total Combining Power</i>).....	122
3.1.2	ELISA direto modificado para avaliação de toxóide epsilon.....	123
3.1.3	ToBI test modificado para avaliação de toxóide epsilon.....	126
4	CONCLUSÃO	133
5	REFERÊNCIAS	134
	CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DA TÉCNICA LIMITE DE FLOCULAÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS CLOSTRIDIAIS	136
	RESUMO	136
	ABSTRACT	137
1	INTRODUÇÃO	138
2	MATERIAL E MÉTODOS	140
2.1	Titulação de antitoxina epsilon presente no soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, pelo método <i>in vitro</i> – Limite de floculação (Lf).....	140
2.2	Limite de floculação (Lf) para a avaliação de toxóide epsilon...	141
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
3.1	Verificação da aplicação do Limite de Floculação avaliando-se soros de coelhos e carneiros imunizados com vacinas anti clostridiose.....	143
3.2	Verificação da aplicação do Limite de floculação (Lf) para análise de toxóide epsilon.....	143
4	CONCLUSÃO	150
5	REFERÊNCIAS	151

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças bacterianas causadas por anaeróbios, as infecções e toxinfecções causadas por bactérias do gênero *Clostridium* estão entre as que mais preocupam os criadores, devido às perdas econômicas que determinam. Essas bactérias produzem toxinas que desencadeiam enfermidades, as quais podem ser classificadas em três grupos: gangrenas gasosas, enterotoxemias e doenças neurotóxicas. As enterotoxemias, caracterizadas pela manifestação de diversos distúrbios, resultam da síntese de toxinas, principalmente pelo *Clostridium perfringens* tipo D, no trato gastrointestinal.

O controle dessas enfermidades é feito, por meio de manejo adequado e da vacinação de todo o rebanho, principalmente onde há diagnóstico de ocorrência das mesmas. A erradicação é praticamente impossível, devido às características dos agentes que estão presentes em diferentes áreas geográficas, dificultando o isolamento e a produção de vacinas específicas. Em decorrência dessa situação, faz-se necessário desenvolver métodos e técnicas, capazes de avaliar a eficiência da proteção imune vacinal, a fim de fornecer ao mercado vacinas de qualidade comprovada (VESCHI, 2002; KENNEDY *et al.*, 1977; UZAL *et al.*, 1997; BLACKWELL *et al.*, 1992).

As vacinas comercializadas no Brasil são compostas de múltiplos antígenos e as normas para controle dessas vacinas estão definidas na legislação do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1997). Em relação ao *C. perfringens* tipo D, exige-se nível mínimo de antitoxina epsilon de 2 UI/mL, determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos por meio da titulação de soros de coelhos vacinados (UNITED STATES, 2006).

Atualmente, o teste de eficiência de vacinas contra clostridioses, bem como a análise dos antígenos que as constituem são realizados *in vivo*, utilizando-se camundongos. Nas últimas décadas, por questões éticas, um grande esforço foi feito para substituir e reduzir o número de animais

utilizados em experimentos de pesquisa, mobilizando cientistas, industriários e laboratórios oficiais. Os testes *in vitro*, ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), ToBI test (*Toxin Binding Inhibition*) e Limite de Floculação podem ser de grande valia para os laboratórios produtores de vacinas, órgãos regulatórios e pesquisadores, uma vez que, utilizando-se técnicas *in vitro*, se reduz o número de animais em testes, além de fornecer resposta confiável, gerando produtos com boa eficácia e segurança para o mercado. Entretanto, para o desenvolvimento de novas técnicas *in vitro*, capazes de substituir as técnicas *in vivo*, é necessário realizar a validação, por se tratar de teste fundamental para a determinação da qualidade das vacinas, que é a parte crítica da segurança das vacinas veterinárias. Dessa forma, há a necessidade de se implementar testes de potência confiáveis, devidamente padronizados e validados, que possam ser utilizados pelas indústrias, antes da liberação dos lotes e pelos órgãos oficiais para os produtos já disponíveis no mercado.

Em decorrência do grande impacto econômico provocado pela presença constante da enterotoxemia em caprinos e ovinos, a prevenção se torna o grande desafio dos produtores desses animais, bem como dos industriários que desenvolvem vacinas clostridiais. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e padronizar testes *in vitro* que possam ser utilizados no controle de qualidade de vacinas contra clostridioses, em substituição ao teste de soro neutralização e análise de toxóide em camundongo. Dessa forma, esse trabalho propõe colaborar com o controle de qualidade de vacinas clostridiais, de forma eficaz, ética e economicamente viável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Clostridium perfringens* tipo D e a Enterotoxemia

As enterotoxemias, caracterizadas pela manifestação de diversos distúrbios, resultam da elaboração de toxinas por *Clostridium perfringens*, no trato gastrointestinal. O excesso de carboidratos no duodeno, especialmente glucose e frutose, estimula o crescimento de *C. perfringens* tipo D residente e, conseqüentemente, a produção de toxina (JONES *et al.*, 2000).

Há cinco tipos de *C. perfringens* (tipos A, B, C, D e E) que devem a sua classificação a uma ou mais dentre as toxinas designadas alfa, beta, epsilon e iota. Há outras, mas essas são as toxinas mais importantes (MARTIN *et al.*, 1988; JONES *et al.*, 2000; UZAL *et al.*, 2002).

A toxina alfa, produzida por todos os cinco tipos, é uma fosfolipase C, que provoca lise celular e hemólise. Essa é a toxina importante na gangrena gasosa, causada por *C. perfringens* (SONGER, 2006; JONES *et al.*, 2000; AWARD *et al.*, 1995).

A toxina beta, produzida pelos tipos B e C, está associada a um aumento da permeabilidade vascular e à ocorrência de necrose (SAWIRES; SONGER, 2006; JONES *et al.*, 2000). Em humanos, essa toxina causa enterite necrótica. A sua massa molar é de aproximadamente 35 kDa (HSIEH *et al.*, 1998) e a DL₅₀ é 310 ng/kg (JIN *et al.*, 1996).

A principal toxina responsável pelo quadro clínico e patológico da enterotoxemia em caprinos e ovinos é a epsilon. Ela é produzida pelos tipos B e D, sendo elaborada como uma prototoxina, que é ativada para uma toxina potente por enzimas proteolíticas, como a tripsina (SAWIRES; SONGER, 2006; JONES *et al.*, 2000). A toxina causa permeabilidade vascular e necrose dos tecidos (SAWIRES; SONGER, 2006; JONES *et al.*, 2000). Essa toxina age no lúmen do endotélio dos capilares cerebrais. O edema extracelular que se desenvolve é resultado da ruptura das junções do endotélio vascular, causando muitos dos sinais clínicos da enterotoxemia, principalmente os sinais neurológicos que ocorrem em casos agudos (BUXTON; MORGAN, 1976). Há relatos de que a toxina epsilon aumenta a

permeabilidade de mucosa intestinal, facilitando a sua própria absorção, passando para a circulação sistêmica poucas horas após ser absorvida. Uzal *et al.* (2003) relata que a toxina epsilon causa danos histológicos às alças do cólon de ovinos e, principalmente, caprinos, sendo mais prontamente absorvida pelo intestino dos caprinos do que pelo dos ovinos.

A toxina iota, produzida pelo tipo E, é também produzida primeiramente sob a forma de uma protoxina e convertida à sua forma ativa por enzimas proteolíticas. Essa toxina aumenta a permeabilidade vascular de forma significativa e causa necrose (JONES *et al.*, 2000; SAWIRES; SONGER, 2006). É produzida somente pelo *C. perfringens* tipo E e tem sido relacionada com as enterotoxemias fatais em bezerros, cordeiros e cobaios (BOSWORTH, 1943; MADDEN *et al.*, 1970). A sua atividade biológica é dermonecrótica e letal. Estudos sugerem que a toxina iota é uma toxina binária, dependente de duas proteínas não ligadas (STILES; WILKINS, 1986).

Os cinco tipos de *C. perfringens* são comuns no trato gastrointestinal de animais. Os tipos C e E são considerados parasitos obrigatórios. Além disso, o tipo A é encontrado no solo (HATHEWAY; JOHNSON, 1998; JONES *et al.*, 2000).

O *Clostridium perfringens* tipo D é uma bactéria pertencente à família *Bacillaceae*, apresenta-se na forma de bastonetes curtos, GRAM-positivas, anaeróbia e imóvel; em condições adversas, forma esporos, sendo responsável pela enterotoxemia em ovinos, em caprinos e em bovinos (HOBBS *et al.*, 1978). Em ovinos, a doença ocorre em cordeiros em regime de engorda e, raramente, em carneiros adultos, sendo conhecida como “doença do rim pulposo” ou “doença da superalimentação” (JONES *et al.*, 2000), tendo distribuição mundial (UZAL *et al.*, 1994; 1998a; ROY; VENKATESWARLU, 1969). No Brasil, foi relatada a ocorrência de morte súbita por enterotoxemia em um rebanho caprino. A doença foi diagnosticada com base no estudo bacteriológico e de isolamento de uma toxina termolábil letal (BALDASSI *et al.*, 1995).

Colodel *et al.* (2003) relataram surtos de enterotoxemia em caprinos, em cinco propriedades no Estado do Rio Grande do Sul. No conteúdo

intestinal, na bacteriologia, foram observadas colônias com bastonetes morfológica e bioquimicamente sugestivos de *C. perfringens*. A soroneutralização em camundongos, em conteúdo intestinal dos animais afetados, revelou a presença de toxina epsilon.

Fatores que alteram o ambiente intestinal, como dietas ricas em carboidratos, em proteínas e pastagens luxuriantes, podem permitir o abundante crescimento de *C. perfringens* tipo D e produção exacerbada de toxinas, desencadeando a enterotoxemia (JONES *et al.*, 2000; KRIEK *et al.*, 1994; SMITH; SHERMAN, 1994).

A enterotoxemia ocorre subitamente, dificultando a observação dos sinais clínicos, porém, algumas vezes, poderá ser detectada num período de 30 minutos até algumas horas, durante o qual o opistótono progride até o coma pré-mortal. Em alguns casos, ocorrem convulsões ao invés do coma, e a morte é mais abrupta. Ocasionalmente, os animais exibem um desejo de empurrar a testa contra uma parede sólida, o que constitui a atitude característica dos “cordeiros cegos e cambaleantes”, observada em muitas formas de indigestão, em várias espécies. Alguns pesquisadores observaram que esses sintomas agudos são precedidos por anorexia e diarréia ou fezes cobertas por muco, pelo menos em alguns animais. Habitualmente, podem ser observadas hiperglicemia e glicosúria (JONES *et al.*, 2000; NAYLOR *et al.*, 1987).

Há diferenças significativas na manifestação clínica nos ovinos e nos caprinos. No entanto, a doença em cabritos e bezerras é semelhante (JONES *et al.*, 2000; UZAL; KELLY, 1998; NAYLOR *et al.*, 1987). A microangiopatia cerebral, caracterizada por acúmulo perivascular de material eosinofílico proteináceo e hemorragias, principalmente na cápsula interna, tálamo, pedúnculos cerebelares e cerebelo, caracteriza a enterotoxemia em ovinos, sendo raramente encontrada em casos de enterotoxemia em caprinos (UZAL *et al.*, 1997; BUXTON, 1978). Nessa espécie, é mais freqüente a ocorrência de lesões intestinais (UZAL *et al.*, 1997; UZAL; KELLY, 1996). No Brasil, não há relatos da ocorrência de enterotoxemia em caprinos, com o quadro de microangiopatia cerebral (COLODEL *et al.*, 2003).

Os sinais da doença, incluindo sintomas neurológicos, puderam ser

reproduzidos após a administração de toxina epsilon purificada em cabras e em cordeiros (SAWIRES; SONGER, 2006). Entretanto, animais que são portadores dessa bactéria podem não mostrar nenhum sinal de enfermidade, quando há um alto nível de enterotoxinas, no trato gastrointestinal (ODENDAAL *et al.*, 1994).

O controle efetivo da enfermidade não pode ser realizado sem a utilização de medidas imunoproláticas. Os caprinos necessitam de níveis séricos de antitoxina mais elevados que os ovinos, para estarem protegidos contra os efeitos da toxina epsilon. Assim, preconizam-se duas doses iniciais, com intervalo de quatro a seis semanas entre elas, além de doses de reforço, a cada três ou quatro meses, durante toda a vida do animal (UZAL *et al.*, 1998).

Em decorrência do grande impacto econômico provocado pela presença constante da enterotoxemia em caprinos, em ovinos e em bovinos em todo mundo, a prevenção se torna o grande desafio dos produtores de caprinos e ovinos, bem como dos industriários que desenvolvem vacinas clostridiais. Dessa forma, este trabalho colabora para a diminuição dessa enfermidade, por meio do desenvolvimento de técnicas *in vitro* para o controle de qualidade de vacinas clostridiais, de forma eficaz e economicamente viável.

2.2 Vacinas Clostridiais

As bactérias do gênero *Clostridium* causam distúrbios que levam a perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento, na grande maioria dos casos, é inviável. Pelo fato dos agentes serem ubiqüitários do trato digestivo dos animais e do solo, e pela forma de resistência na natureza por meio de esporos, a erradicação das enfermidades é praticamente impossível. Assim, o controle e a profilaxia devem se basear em medidas adequadas de manejo e em vacinações sistemáticas de todo o rebanho, uma vez que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades (LOBATO; ASSIS, 2000).

A eficiência das vacinas clostridiais depende da qualidade dos

antígenos presentes nas mesmas, sendo esses toxóides e/ou bacterinas. Quando bem elaboradas, as vacinas são altamente imunogênicas, oferecendo boa proteção aos animais. As vacinas comerciais são combinadas ou compostas por múltiplos antígenos e são usadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e/ou toxinas que podem participar das enfermidades (LOBATO; ASSIS, 2000).

As indústrias de produtos veterinários estão se empenhando, em todo mundo, para desenvolver vacinas eficientes no combate às clostridioses. A demanda do mercado, conforme descrito anteriormente, é por vacinas polivalentes, isto é, que combatem várias enfermidades em uma única vacinação. As vacinas contra clostridioses disponíveis no mercado brasileiro se propõem ao combate da maioria das diferentes enfermidades identificadas no campo, entre elas: botulismo, enterotoxemia, doença do rim pulposo, hepatite necrótica infecciosa, gangrena gasosa, carbúnculo sintomático e tétano (MOZZER, 2004).

Nos últimos anos, a produção e o uso das vacinas clostridiais vêm aumentando consideravelmente no Brasil, devido ao seu caráter agudo e ao tratamento ineficiente. As normas para o controle de qualidade das vacinas estão definidas na legislação do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1997). Entretanto, até o ano de 2007, apenas o *C. botulinum* e *C. chauvoei* eram submetidos a controle oficial de potência, sendo, portanto, a qualidade dos produtos para os demais clostrídios deixados a cargo das Indústrias produtoras (LOBATO; ASSIS, 2000). A partir de 2008, implementou-se controle oficial para o *Clostridium perfringens* tipo C e D.

É importante mencionar que, para a avaliação da potência de vacinas clostridiais, o método convencionalmente utilizado, a soroneutralização em camundongos, vem sofrendo críticas pelos grupos humanitários, devido à variabilidade dos resultados e a questões éticas relevantes. Para contornar esse impasse, estudos têm sido desenvolvidos, no sentido de avaliar e padronizar técnicas *in vitro* que possam substituir as metodologias *in vivo*, sem acarretar perdas na confiabilidade dos resultados. Dentre as metodologias *in vitro*, pode-se citar, como exemplo, o ELISA, empregado para a detecção de anticorpos produzidos contra toxinas beta e epsilon de *C.*

perfringens tipo C e D (PARREIRAS, 2001; UZAL *et al.*, 1997; SOJKA, 1989) e o emprego de cultivos celulares (SOUZA JÚNIOR, 2005; KNIGHT *et al.*, 1990).

Nesse contexto, este trabalho teve o objetivo principal de avaliar métodos *in vitro* eficazes e viáveis, para o controle de qualidade de vacinas clostridiais, antes de essas serem colocadas para venda no mercado nacional e internacional.

2.3 Controle de Qualidade de Vacinas

2.3.1 Testes *in vivo*

2.3.1.1 Teste convencional - Soroneutralização

Relatos da literatura mostram que a potência do *Clostridium novyi* tipo B, *C. septicum*, *C. perfringens* tipo C e D e *C. sordellii*, componentes de vacinas polivalentes contra clostridioses de ruminantes, é atualmente testada pela sua habilidade de estimular resposta imunológica em coelhos. Essa potência é mensurada *in vivo*, usando-se a neutralização de toxina em camundongo (UNITED STATES, 2006; BRITISH PHAMACOPOEIA, 1988). Apesar desses testes serem considerados como sensíveis e seguros, eles são demorados (3 a 4 dias) e podem ser imprecisos, às vezes, variando a sensibilidade entre animais, sendo conclusivo apenas após se obter uma série de resultados. Esses testes também são relativamente caros e requerem um grande número de camundongos (NAYLOR *et al.*, 1987).

Para contornar essa situação, muitos métodos alternativos foram avaliados e propostos, dentre eles a hemaglutinação (GUPTA; SIBER, 1994), o ELISA (EL IDRISSEI; WARD, 1992a; EL IDRISSEI; WARD, 1992b; NAGAHAMA *et al.*, 1991), difusão radial simples (MANCINI *et al.*, 1971), fixação do complemento (MARUCCI; FULLER, 1971), aglutinação em látex (MARTIN; NAYLOR, 1994), reação em cadeia da polimerase (HAVARD *et al.*, 1992) e a utilização de linhagens contínuas de células (PAYNE *et al.*, 1994; KNIGHT *et al.*, 1990).

Muitos são os testes *in vitro* que têm sido exaustivamente comparados com o método tradicional *in vivo*, para se avaliar a imunogenicidade de vacinas clostridiais. No entanto, muitos dos métodos avaliados foram considerados inadequados para serem utilizados no controle de qualidade de vacinas contra clostridioses, devido às baixas sensibilidade e estabilidade dos reagentes utilizados (MANGHI *et al.*, 1994). Dessa forma, a substituição das metodologias *in vivo* por metodologias *in vitro* requer um estudo de validação sistemática para a promoção da segurança e a confiabilidade dos resultados. Segundo Levings *et al.* (1993), a validação desses métodos é determinada pela especificidade, pela sensibilidade e pela reprodutibilidade.

A quantificação de toxinas e de toxóides epsilon, por meio de métodos *in vitro* tem sido pouco adotadas no Brasil, sendo a quantificação *in vivo* utilizando-se camundongo o método mundialmente aceito para esse fim. Atualmente, no Brasil, o controle de qualidade de vacinas contra clostridioses tem sido realizado *in vivo*, seja por desafio de cobaias ou soroneutralização em camundongos. O *Code Federal Regulation* (CFR) tem sido o guia sugerido pelos órgãos oficiais e adotado pelas indústrias para a realização do teste de potência de vacinas contra clostridioses para os antígenos de *C. perfringens* tipo C e D, *C. sordelli*, *C. novyi*. Para a avaliação da potência frente ao *C. septicum*, preconiza-se o recomendado na *British Pharmacopoeia* (1988), conforme recomenda a Portaria número 49, de 1997, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

2.3.1.2 TCP – Total Combining Power

Há poucos relatos da literatura sobre os métodos de controle de qualidade de toxóide epsilon, por meio da técnica *in vivo*. A técnica TCP – *Total Combining Power* tem sido a principal técnica adotada para esse fim. Entretanto, não há descrição da técnica de forma a viabilizar a sua reprodução. O teste TCP envolve a neutralização parcial de uma dose fixa de antitoxina, com uma série de doses variantes do toxóide que está sendo testado. A antitoxina que não reage com o toxóide é então misturada com uma dose fixa de toxina, equivalente à metade da dose de antitoxina utilizada

e toda a série de misturas é inoculada em camundongos, que são observados por dois dias. O toxóide presente na mistura que mata metade dos camundongos, nos quais foram inoculados, é equivalente à dose fixa de toxina usada (WALKER *et al.*, 1979).

Brandi (2007) validou a metodologia de quantificação de toxóide, TCP, mostrando que é uma técnica que apresenta robustez, é precisa, específica e oferece resultados com linearidade, ao ser realizado, utilizando-se diluições seriadas. Esse autor sugeriu também que é necessário, além do uso do TCP para o controle de toxóide epsilon, o uso da técnica *in vivo* L+, na fase do processo de produção em que a toxina ainda está ativa. A compilação dos resultados de L+ e TCP determinariam, com mais precisão, a qualidade dos antígenos utilizados em vacinas.

2.3.2 Testes *in vitro*

2.3.2.1 ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Testes *in vitro* são de grande valia para os laboratórios produtores de vacinas, os órgãos regulatórios e os pesquisadores, uma vez que o mercado carece de produtos com boa eficácia e segurança. O teste de potência é a parte crítica da segurança das vacinas veterinárias, sendo necessária a utilização de métodos validados para a obtenção de resultados confiáveis (LEVINGS *et al.*, 1993). Dessa forma, esse autor relata a necessidade de se implementar testes de potência, devidamente validados, que possam ser utilizados tanto nas indústrias, antes da liberação dos lotes, quanto para os produtos já disponíveis no mercado.

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura tem sido realizada com o intuito de substituir o teste de neutralização de toxina em camundongos por ELISA. Mas foi relatado, por alguns autores, que essa técnica não apresentou uma boa correlação com o método *in vivo*, quando se utilizaram soros com níveis baixos de anticorpos, por exemplo, na titulação de soro humano (WOOD, 1991; HENDRIKSEN *et al.*, 1988 e HAGENAARS *et al.*, 1984). No entanto, para contornar essa situação, Wood (1991) propõe

o ELISA como um método alternativo satisfatório, para mensurar a potência de vacinas clostridiais, utilizando-se soro de coelhos imunizados, quando o nível de anticorpos no soro é relativamente alto.

Em estudo realizado por Gupta e Siber (1994), com o objetivo de comparar o título de antitoxina tetânica em soro de camundongo e cobaios imunizados, por meio do teste de neutralização de toxina em camundongo e ELISA, observou-se que, no teste de neutralização da toxina, a quantidade detectada de anticorpo, no soro de cobaio imunizado, foi insignificante ($< 0,0025$ AU/mL) até 9 dias após a imunização. No entanto, por meio do ELISA, o título de anticorpo variou de 0,18 a 0,71 EAU/mL. Quatro semanas após, o título de anticorpo obtido pelo método ELISA foi ainda seis vezes maior que o título obtido pelo teste de neutralização de toxina. Somente após a sexta semana da imunização, os títulos obtidos pelos dois métodos em estudo foram similares, mostrando um coeficiente de correlação de 0,88.

Dessa forma, não houve diferença significativa entre os testes de neutralização de toxina e ELISA, após esse período de imunização. Em se utilizando o soro de camundongos para a comparação dos dois métodos, verificou-se também que o título de anticorpos detectado pelo método de neutralização de toxina foi muito baixo ($< 0,005$ AU/mL), quando comparado com o ELISA (0,13 a 0,66 EAU/mL), até o sétimo dia após a imunização. E ainda, 4 semanas após a inoculação, os títulos de IgG obtidos por ELISA foram aproximadamente cinco vezes maiores que o título obtido na neutralização de toxina. Contudo, observou-se que há correlação entre neutralização de toxina e ELISA ($r = 0,89$, $p < 0,0005$), quando os títulos de anticorpos se elevavam.

Além de outros trabalhos, Hagenaars *et al.* (1984) e Hendriksen *et al.* (1988) também relataram a obtenção de pobre correlação dos resultados obtidos pelas duas técnicas, quando os títulos de anticorpos no soro são baixos. Por outro lado, boa correlação foi observada nos títulos de antitoxina tetânica, em soro humano, obtidos por ELISA e teste de neutralização de toxina em camundongo, quando o soro sanguíneo apresentava altos títulos de anticorpos (HABEEB, 1975).

Em decorrência das inúmeras controvérsias acerca da metodologia,

muitas críticas têm surgido com relação à substituição do teste de neutralização de toxina em camundongo por ELISA, principalmente quando se realiza a titulação em soro sanguíneo humano, particularmente para a antitoxina do *Clostridium tetani* (GUPTA; SIBER, 1994).

A justificativa para esses achados pode ser esclarecida pelo princípio básico da metodologia. O ELISA é uma ligação específica anticorpo e antígeno, mas que não diferencia anticorpos de diferentes qualidades, por exemplo, anticorpo neutralizante de não neutralizante. O teste de neutralização de toxina em camundongo, por sua vez, mensura apenas anticorpos protetores. Dessa forma, se o ELISA não mensura necessariamente o anticorpo protetor, mas as duas categorias de anticorpo, protetor e não protetor, seria esperado que o ELISA produzisse, consistentemente, maiores resultados que o teste de neutralização de toxina em camundongo. No entanto, não foi o caso no trabalho realizado por Wood (1991). Entretanto, outros autores conseguiram mensurar essas variações.

Há diversos tipos de ELISA que são utilizados para avaliar a eficiência de uma grande variedade de microrganismos presentes em vacinas. Roskopf-Streicher *et al.* (2003) utilizaram o ELISA competitivo para quantificar antitoxina epsilon de *C. perfringens* tipo D, em soro de coelho. Nesse estudo, esses autores observaram que a validade do teste foi dificultada pela falta de linearidade e paralelismo em algumas das amostras testadas. A maioria das vacinas utilizadas no referido trabalho estimulou respostas imunológicas por volta de 10 UI/mL e uma das vacinas apresentou título de 38 UI/mL. No entanto, nenhuma vacina demonstrou potência abaixo de 5UI/mL. Os autores relataram a necessidade de se utilizar vacinas de baixa potência nas análises de validação, para avaliar a sensibilidade da técnica em estudo. Ainda, segundo esses autores, o ELISA competitivo se mostrou altamente específico e, além disso, a sua execução independe da utilização de toxinas purificadas para cobrir as placas.

Parreiras (2001), tendo padronizado a curva para cálculo da potência de soros pelo ELISA competitivo, utilizou antitoxina padrão cuja potência foi calculada pelo ELISA e os resultados obtidos foram correlacionados com os resultados esperados na soroneutralização. Nesse estudo, os títulos

estimados por ambos os testes foram similares, com coeficiente de correlação entre eles de 0,99. Ao utilizar soro hiperimune de carneiro, esse autor encontrou coeficiente de correlação de 0,94 entre os dois métodos. No entanto, quando o autor utilizou soro de 40 bovinos imunizados, o coeficiente de correlação foi de 0,86. Nesse 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 de soroneutralização e para padronizar a curva padrão do ELISA.

Uzal *et al.* (1997) padronizaram as técnicas ELISA indireto e competitivo e avaliaram a eficiência das mesmas em detectar antitoxina epsilon, presente em soro de cabras imunizadas. Ambas as técnicas foram comparadas com a soroneutralização em camundongo e obtiveram coeficientes de correlação iguais a 99 e 98% para o ELISA indireto e competitivo respectivamente. Na elaboração de uma curva padrão para o teste de potência de vacinas, podem ser utilizadas transformações matemáticas para melhor entender os resultados. Uzal *et al.* (1997, 1998) e Parreiras (2001) utilizaram a transformação logarítmica dos títulos de antitoxina, no intuito de linearizar a curva.

Sojka *et al.* (1989) realizaram trabalho semelhante, comparando a técnica ELISA competitivo e soroneutralização em camundongo. Esses autores utilizaram soro padrão contendo 20 UI/mL, titulado previamente *in vivo*. Na realização do teste, os soros avaliados competiam na ligação entre o anticorpo monoclonal, que neutralizava a toxina epsilon, e o toxóide epsilon, adsorvido na placa. O resultado encontrado foi igual a 93% de correlação entre as duas metodologias utilizadas.

Para a avaliação de imunogenicidade de outras vacinas bacterianas, como as diftéricas, o ELISA tem sido utilizado com sucesso. Em decorrência da sensibilidade e da reprodutibilidade que essa técnica apresenta para estimar o nível de anticorpo no soro sanguíneo (MANGHI *et al.*, 1994), foi utilizada para estimar a potência, de toxóide diftérico, em estimular resposta imunológica em animais. No referido estudo, verificou-se uma boa correlação entre o teste de neutralização de toxina em camundongo e ELISA, quando

utilizados para mensurar títulos de anticorpos em soro de cobaias imunizados.

A especificidade do teste ELISA pode ser avaliada, quando se estima o nível de uma antitoxina específica em soro de coelho, imunizado com vacinas monovalentes. Dessa forma, o nível de anticorpos apenas será detectado no soro imunizado com o antígeno específico para a antitoxina, à qual se destina o teste ELISA. Como exemplo, a especificidade do ELISA competitivo foi comprovada, quando apenas o soro proveniente do coelho imunizado com monovacina de *C. perfringens* tipo D apresentou nível significativo de antitoxina epsilon no teste ELISA (EBERT *et al.*, 1991).

Quanto à sensibilidade, o teste ELISA pode ser de 10 a 1000 vezes mais sensível que a soroneutralização em camundongos (NAGAHAMA *et al.*, 1991). Essa ocorrência justifica a previsão de uso do ELISA, para o teste de potência de vacinas para *C. botulinum* na British Pharmacopeia (1988) e o ELISA, para o controle de qualidade do toxóide tetânico, que já é uma realidade (PARREIRAS, 2001).

O ELISA tem sido descrito não só apenas como uma técnica para mensurar anticorpos em soros de animais imunizados. Outra utilização da técnica ELISA é para a detecção de toxina, seja em conteúdo intestinal para diagnóstico ou em cultivos industriais destinados à produção de vacinas. Nesse contexto Nagahama *et al.* (1991) relataram que a sensibilidade do ELISA com anticorpos específicos para a detecção de beta, epsilon e iota toxinas de *C. perfringens* pode chegar a 1,0 mg/mL, para as toxinas beta e iota purificadas e 0,1 ng/mL de toxina epsilon purificada. A quantidade de 2,0 ng/mL de toxina epsilon purificada em PBS, acrescido de 0,05% de Tween 20, foi detectada por El Idrissi e Ward (1992a). Uzal *et al.* (2003) relataram a detecção de 0,075 DL₅₀ / mL de toxina epsilon, no conteúdo intestinal. Em um trabalho realizado, comparando-se o ELISA sanduíche e a soroneutralização para a detecção de toxinas beta e epsilon, em conteúdo intestinal, constataram-se sensibilidade e especificidade de 90,5% e 89,2% para a toxina beta e 97,4% e 94,6% para a toxina epsilon (EL IDRISSE; WARD, 1992b).

Os benefícios da substituição do teste de neutralização de toxina em

camundongo pelo ELISA são significantes e incluem a redução substancial no uso de camundongos, que é de importância ética e econômica e ainda reduz o tempo para se mensurar a potência de vacinas de 3 a 4 dias para aproximadamente 3 horas, embora haja as controvérsias, já mencionadas acima (WOOD, 1991).

2.3.2.2 ToBI test - *Toxin Binding inhibition test*

O ToBI test se baseia na inibição da ligação entre toxina e antitoxina, que se encontra adsorvida a uma microplaca, por anticorpos, pré-incubados, provenientes de animais imunizados. Assim, o soro de um animal, que foi previamente imunizado, será pré-incubado juntamente com uma toxina específica. Após esse período de incubação, a mistura é adicionada a uma microplaca, coberta por antitoxina padrão homóloga. Na seqüência, será adicionado IgG de carneiro, marcado com enzima, que se ligará à toxina que ficou livre na microplaca. Finalmente, um substrato cromógeno foi adicionado, provocando a mudança de cor, mensurando-se por espectrofotometria (BONETTI, 2002).

Primeiramente, o ToBI test foi desenvolvido para determinar o título de antitoxina contra a toxina tetânica e diftérica em soro humano (HENDRIKSEN *et al.*, 1988). Posteriormente, Hendriksen *et al.* (1989) utilizaram o ToBI test, para estimar a potência do toxóide diftérico, baseado na indução de antitoxina em camundongo. Mais tarde, Hendriksen *et al.* (1991) realizaram um estudo, no qual se-utilizou o ToBI test para estimar a potência do toxóide tetânico presente em vacinas. Esses autores relataram que o ToBI test pode ser uma alternativa para substituir o desafio letal em camundongos, devido à capacidade em estimar níveis de antitoxina neutralizantes em amostras de soro de animais imunizados e ainda afirmaram que há correlação entre os resultados obtidos por ToBI test e desafio letal em camundongos. O ToBI test é de fácil execução, sensível e altamente reprodutível e requer apenas pequenas quantidades de soro para a sua realização.

A validade do ToBI test para avaliar potência de vacinas antitetânicas foi estudada em vários experimentos. No primeiro experimento, o nível de

antitoxina foi estimado tanto pelo ToBI test quanto pela soroneutralização em camundongo. Foi encontrado que uma densidade ótica maior que 1,2; obtida no ToBI test, corresponde à morte em um dia após a inoculação da mistura soro-toxina, no teste de soroneutralização. Densidade ótica maior que 0,5 geralmente foi relacionada com a morte de animais dentro de quatro dias. Animais inoculados com a mistura soro-toxina com densidade ótica entre 0,3 e 0,5 morreram no terceiro ou quarto dia e outros sobreviveram. Finalmente, animais inoculados com a mistura soro-toxina com densidade ótica menor que 0,3 no ToBI test sobreviveram no período experimental, exceto para um animal, que morreu por uma causa não específica. Os resultados obtidos nesse experimento confirmam o fato de haver correlação entre o ToBI test e a soroneutralização em camundongo (HENDRIKSEN *et al.*, 1991).

Em estudo realizado por Matos *et al.* (2002), o ToBI test foi utilizado para determinar os níveis de antitoxina tetânica em soro de cobaias imunizadas com diferentes lotes de vacinas dT (difteria e tétano) e DTP (difteria, tétano e pertussis). Esses resultados foram comparados com o teste *in vivo*, soroneutralização em camundongo, usado rotineiramente para medir a potência de vacinas, contendo o toxóide tetânico em sua composição. Os títulos de antitoxina obtidos no ToBI test foram de 1,8 a 3,5 UI/mL, para a vacina dT e de 2 a 4 UI/mL, para a vacina DTP. Os resultados obtidos na soroneutralização em camundongo foram 1,4 a 3 UI/mL, para a vacina dT e de 1,8 a 3,5 UI/mL para a vacina DTP. As análises estatísticas, de acordo com o método de Kruskal-Wallis, utilizadas para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, mostraram que não houve diferença significativa entre os métodos *in vitro* e *in vivo*, em sete e três experimentos realizados separadamente para todos os lotes de vacinas dT e DTP analisados. Os resultados obtidos por ToBI test evidenciaram alta homogeneidade, demonstrando excelente correlação entre as vacinas dT ($r=0,940$ e $p=0,000$) e DTP ($r=0,951$ e $p=0,000$).

Gun *et al.* (1996) realizaram a titulação de soro de humanos imunizados contra tétano, comparando-se métodos *in vivo* e ToBI test. Esses autores observaram que há boa correlação ($r = 0,89$) entre o método *in vitro* e

a soroneutralização em camundongo e ainda forte correlação com o método de desafio, utilizando-se toxina tetânica. Quando encontraram um resultado superestimado no ToBI test, os autores atribuíram a ocorrência do fato à presença de LPS nas vacinas utilizadas. Essa substância pode ter interferido nos resultados.

Comparando-se quatro métodos sorológicos (ToBI-ELISA, Toxóide-ELISA, Hemaglutinação passiva e Aglutinação em látex) para detecção de anticorpo anti-toxina diftérica, o ToBI-ELISA foi o que apresentou a maior sensibilidade, associada à maior correlação com o teste de referência. Para as amostras com um título abaixo de 0,1 IU/mL, como diagnosticado pelo teste de referência, 96% foram corretamente identificados pelo ToBI-ELISA. Não houve dispersão de diferenças entre os resultados de ToBI-ELISA e o método de referência, o que sugere total reprodutibilidade para ambos os testes, apesar do fato que o ToBI-ELISA mostrou menor poder discriminativo (WALORY *et al.*, 2000).

Em 2005, foi realizado um estudo, no qual o ToBI test foi executado, com o objetivo de detectar toxina livre na mistura toxina-antitoxina, por meio de um ELISA, sendo o ToBI test diferenciado da neutralização da toxina *in vivo* apenas via caminho pelo qual a toxina é detectada. Os resultados desse trabalho revelaram que os valores de antitoxina mensurados por neutralização da toxina foram 10; 5; 5 e 20 UI para beta, epsilon, alfa e antitoxina tetânica, respectivamente. Os valores correspondentes obtidos no ToBI test foram 11, 5, 5 e 21, respectivamente. Assim, evidenciou-se, que há uma significativa correlação entre a neutralização de toxina e ToBI test, para estimar o nível de antitoxina tanto em soro de coelho ($r = 0,890$) quanto em soro de carneiro ($r = 0,994$) (FAYEZ *et al.*, 2005).

Amostras do soro de 191 adultos saudáveis, vacinados com diferentes doses de vacinas antitetânicas foram tituladas por soroneutralização em camundongos, pelo toxoid-ELISA e pelo ToBI test. As comparações mostraram uma melhor correlação entre o ToBI test e a soroneutralização do que entre o toxoid-ELISA e a soroneutralização. Além disso, não foi observada nenhuma superestimação do título de anticorpos pelo ToBI test, quando os níveis de anticorpos se apresentavam baixos na

soroneutralização. Ao contrário, diversos resultados falsos positivos foram obtidos, ao usar o toxoid-ELISA (HENDRIKSEN *et al.*, 1988). As mesmas considerações foram feitas por Hendriksen *et al.* (1989), ao avaliarem o soro de 140 crianças, imunizadas para tétano e difteria, por meio dos métodos soroneutralização em camundongo, ToBI test e neutralização de toxina em células. Concluiu-se que o ToBI test é uma alternativa confiável e precisa para substituir a soroneutralização em camundongos e pode ser executado sob condições simples do laboratório, em um curto período de tempo (HENDRIKSEN *et al.*, 1988).

2.3.2.3 Limite de Floculação (Lf)

A técnica limite de floculação é uma proposta para substituir os métodos *in vivo* de controle de qualidade de vacinas, sendo de fácil execução, direto, rápido e econômico, o que faz com que seja uma técnica muito conveniente para substituir a utilização de animais nas análises de controle de qualidade de vacinas (SPAUN; LYNG, 1970).

Ramon (1922) verificou que uma série de tubos contendo uma quantidade fixa de toxina diftérica, completada com quantidades variáveis de soro antidiftérico, formava-se um floculado, que aparecia primeiro num determinado tubo da série, no qual ocorreu o ótimo de floculação. Posteriormente, Dean e Webb (1926 *apud* SPAUN; LYNG, 1970) utilizaram um método similar, porém colocando quantidades variáveis de toxina e quantidades fixas de antitoxina para encontrar o ponto ótimo de floculação.

Em seguida, Levine e Wyman (1965) avaliaram três métodos de floculação para comparar a equivalência entre toxóide e antitoxina, obtida pelos métodos avaliados. Os métodos utilizados foram: Ramon (1922), Dean e Webb (1926) e a lei das massas, no qual se varia tanto a quantidade de toxina quanto de antitoxina. Nos três métodos avaliados, verificou-se a variação no tempo de ocorrência da floculação, na medida em que se aproximava da equivalência ótima, ou seja, os tubos que primeiro floculavam eram aqueles onde existia a melhor equivalência toxina / antitoxina. No entanto, foi demonstrado que a relação de equivalência variava entre os três

métodos avaliados. Lyng e Bentzon (1987) também analisaram os três métodos acima citados, para estimar a quantidade de toxóide e antitoxina tetânica, em diferentes amostras. Esses autores observaram que a proporção entre toxina e antitoxina variava de método para método, uma vez que encontraram valores iguais a 0,87; 1 e 1,14 para os métodos de Ramon, lei das massas e Dean-Webb, respectivamente. Os resultados obtidos por Bowen e Wyman (1953) corroboram os dados informados anteriormente, pois verificaram que a proporção toxina / antitoxina não apresentou concordância entre os métodos de Ramon e Dean-Webb. Na maioria dos casos, o método de Ramon apresentava maior relação toxina antitoxina para o tubo onde ocorre a ótima equivalência entre toxina e antitoxina.

Orlans *et al.* (1960) mensuraram a quantidade de toxóide epsilon, utilizando o limite de floculação proposto por Dean e Webb (1926 *apud* SPAUN; LYNG, 1970), encontrando resultados de 100 a 150 Lf/mL, sendo que o tubo que apresentava a quantidade ótima de equivalência entre toxina e antitoxina floculou em 20 minutos. Nesse mesmo trabalho, relatou-se que a relação entre a neutralização *in vivo* e o limite de floculação foi igual a 1,08 e 1,10; em duas análises de 10 amostras de soro cada uma.

No trabalho realizado por Spaun e Lyng (1970), utilizando toxina ou toxóide tetânico com concentração de 5 a 50 Lf/mL, observou-se que o título de anticorpos variou mais no método *in vitro* que o método *in vivo*. Esse ocorrido pode ser justificado pela utilização de toxina ou toxóide em diferentes concentrações. Além disso, a temperatura de incubação também foi variável de 37 a 52 °C. Esses relatos evidenciam a importância de se usar reagentes e temperaturas padronizados, a fim de evitar discrepância nos resultados.

A relação entre o título de antitoxina, obtido *in vivo* e *in vitro*, deve ser a mais próxima possível de um, uma vez que, em ambos os testes, se estimam a quantidade de antitoxina, equivalente à quantidade de toxina ou toxóide padrão utilizado. Spaun e Lyng (1970) obtiveram resultados iguais a 1,40 e 1,36, em média, para a relação *in vivo* / *in vitro* relativa e absoluta, respectivamente. No entanto, a relação *in vivo* / *in vitro* deve ser padronizada para cada sistema individualmente, devido às características inerentes aos

diferentes sistemas.

Dados da literatura mostram que o tempo de floculação do primeiro tubo varia em decorrência do tipo de amostra utilizada. Para o toxóide diftérico, encontraram-se tempos de floculação iguais a 8,8 (\pm 0,4) e 9,7 (\pm 0,4) minutos, para amostras com concentrações de 196,3 (\pm 3,1) e 172,9 (\pm 3,1) Lf/mL, sendo a concentração da antitoxina padrão utilizada igual a 25 UI/mL. Para o toxóide tetânico, com 25 Lf/mL, tempos maiores (19 minutos) foram necessários para iniciar a floculação (IWAKI *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que amostras mais concentradas floculam em um tempo menor, evidenciando a qualidade do antígeno utilizado.

Apesar de todas as vantagens advindas da utilização de técnica limite de floculação, em substituição aos tradicionais métodos *in vivo*, Iwaki *et al* (2007) relatam que as análises que envolvem leituras visuais são demasiadamente subjetivas, apresentando baixa reprodutibilidade, devido à grande variação de pessoa para pessoa.

São escassos, na literatura, dados sobre a utilização do limite de floculação para o controle de qualidade de vacinas contra *C. perfringens* tipo D. Diante do exposto, verifica-se a necessidade de se avaliar metodologias *in vitro* eficazes e confiáveis para o controle de qualidade de vacinas contra *C. perfringens* tipo D, tendo em vista a grande importância econômica dessa enfermidade para os criadores de ovinos e caprinos do Brasil e do mundo.

Uma vez que os estudos abordados pela literatura sobre metodologias *in vitro* ainda não são conclusivos, para substituir os rotineiros testes *in vivo*, este trabalho objetivou a avaliação e a comparação do ELISA, ToBI test e Limite de Floculação com os tradicionais métodos utilizando-se camundongos.

2.4 Utilização de Animais em Experimentos de Pesquisa

A ciência, por muito tempo, teve a influência filosófica de René Descartes, que afirmava que os animais não tinham alma, que eram autômatos e, portanto, incapazes de sentir e sofrer. Não há dúvida de que esse postulado era bastante conveniente para contestar qualquer alegação

de crueldade nas pesquisas científicas. Entretanto, os próprios trabalhos científicos ajudaram a derrubar esse conceito (MEZADRI *et al.* 2004).

Os experimentos com animais não são eticamente válidos, se houver métodos alternativos fidedignos para o conhecimento que se procura. O princípio ético de reverência pela vida exige que se obtenha um ganho maior de conhecimento com um custo menor no número de animais utilizados e com o menor sofrimento dos mesmos (RIVERA, 2002).

A preocupação com o bem-estar dos animais de laboratório e a tentativa de preservar esses animais contra o uso em experimentos de pesquisa são muito mais antigos do que se possa imaginar. Fergusson, em 1760, já se preocupava com os métodos bárbaros usados em animais. No século XIX, o fisiologista Jeremy Bentham lançou a máxima: “A questão não é se os animais raciocinam, nem se eles podem falar, mas, se eles sofrem” (FRANÇA, 2000).

Em 1842, foi fundada a primeira sociedade protetora dos animais, a British Society for the Prevention of Cruelty to Animals, mais tarde Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Mas foi em 1959, com a publicação do livro “Principles of Humane Experimental Technique”, que Russel e Burch lançaram o conceito dos 3 Rs. Foi a partir daí que realmente foi dado o impulso para tudo o que se fala e se estuda hoje envolvendo os métodos alternativos (FRANÇA, 2000).

Dessa forma, os dois cientistas ingleses, Russell e Birch (1959 *apud* REMFRY, 1987), conseguiram sintetizar, com 3 palavras, o Princípio Humanitário da Experimentação Animal. Essas palavras começam, em inglês, com a letra R e, por isso, é o Princípio dos 3 Rs. As palavras são *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*. O *Replacement*, traduzido como Alternativas, indica que sempre que possível deve-se usar, no lugar de animais vivos, materiais sem sensibilidade, como cultura de tecidos, modelos em computador. Os mamíferos devem ser substituídos por animais com sistema nervoso menos desenvolvido. *Reduction* ou Redução significa que já se deve usar animais em certos experimentos. Então, o número de animais utilizados deverá ser o menor possível, desde que se forneçam resultados estatísticos significativos. O número de animais usados já reduziu muito,

porque se utilizam animais sadios e geneticamente conhecidos. Também o delineamento experimental e a análise estatística fazem com que o número exigido seja menor do que se pensava. *Refinement* ou Aprimoramento implica em que as pessoas só devem usar animais, quando bem treinadas para tal, pois uma simples injeção pode causar muita dor, quando dada por pessoa inexperiente. A utilização de materiais e técnicas menos invasivas, o treinamento de pessoas são base para o aprimoramento do bem-estar animal. Além disso, esse conceito aponta para a necessidade de se utilizar os modelos animais, isto é, explorar, ao máximo, todas as informações que se tem de um ensaio com animais, de modo que se tenha um ensaio mais confiável (RIVERA, 2002).

Dentro do conceito dos 3 Rs, foi feito um grande esforço para se desenvolver testes *in vitro* que fossem úteis ao desenvolvimento e ao controle de imunobiológicos e de novos fármacos. No caso de desenvolvimento de novos medicamentos, a busca de princípios ativos, originados de produtos naturais e sintéticos que sejam eficazes foi extremamente beneficiada com o advento dos testes *in vitro*. Além de diminuir drasticamente o número de animais e dar uma maior agilidade às pesquisas, esses testes costumam diminuir enormemente os custos da busca por novos fármacos (MULLER; FRANCO, 2000).

O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*, procurando colaborar no aprimoramento das condutas dirigidas à experimentação em animais no país, elaborou os artigos referentes aos Princípios Éticos da Experimentação Animal. Nesses artigos, destaca-se um conteúdo que encerra três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência (SCHNAIDER; SOUZA, 2003).

O maior obstáculo a ser vencido para uma efetiva implementação dos ensaios alternativos é o que se chama de validação. Esse processo implica em que uma determinada metodologia deva estar harmonizada e seja feito estudo colaborativo, envolvendo diversos laboratórios que procedem à análise das mesmas amostras e os resultados obtidos são estatisticamente analisados. Uma vez estabelecidos os parâmetros e tendo-se uma

distribuição homogênea desses resultados, o ensaio poderá ser validado (FRANÇA, 2000).

Mesmo perante as dificuldades de se implementarem testes alternativos *in vitro* para as análises biológicas, muitos são os benefícios que contrabalanceiam os empecilhos existentes. Dentre os pontos negativos de se utilizar animais em experimentos de pesquisa, destacam-se: custos onerosos, resultados imprecisos, desconforto animal e, ainda, a dificuldade de descarte de animais, de forma adequada. Em biossegurança, o descarte de carcaças é um ato que requer grande senso de responsabilidade, por parte do profissional que o está executando (CARDOSO, 2002), tanto para a segurança pessoal quanto para o meio ambiente.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar metodologias *in vitro*, para o controle de qualidade de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo D, em comparação aos testes *in vivo*, rotineiramente utilizados.

O trabalho contemplou os seguintes objetivos específicos:

- avaliar e padronizar a técnica imunoenzimática ELISA e compará-la com a soroneutralização em camundongos, na titulação de anticorpos vacinais, frente ao toxóide epsilon;
- avaliar e padronizar o ToBI test, para que possa ser utilizado no controle de qualidade de vacinas contra clostridioses, em comparação ao teste de soroneutralização;
- avaliar e padronizar as metodologias *in vitro*, ELISA e ToBI test, para a análise de toxóide epsilon, em comparação ao teste *in vivo* TCP;
- avaliar e padronizar a técnica de Limite de Floculação e comparar a sensibilidade da mesma com a soroneutralização em camundongo, na titulação de anticorpos vacinais, frente ao toxóide epsilon, e TCP, na avaliação de toxóide epsilon.

4 REFERÊNCIAS

AWARD, M. M.; BRYANT, A. E.; STEVENS, D. L.; ROOD, J. I. Virulence studies on chromosomal beta-toxin and epsilon-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of beta-toxin in *Clostridium perfringens* mediated gas gangrene. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 191-202, Jan. 1995.

BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; PORTUGAL, M. A. S. C.; MOULIN, A. A. P.; MOURÃO, M. A. E. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 32, n. 2, p. 109-113, Feb. 1995.

BLACKWELL, T. E.; BUTLER, D. G.; PRESCOTT, J. F.; WILCOCK, B. P. Clinical signs, treatment, and postmortem lesions in dairy goats with enterotoxemia: 13 cases (1979 – 1982). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 2, p. 214-217, Feb. 1992.

BONETTI, T. C. S. **Anticorpos antitetânicos e antidiftéricos e resposta a reforço vacinal em mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV-1**. 2002. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Aplicadas à Pediatria) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2002.

BOSWORTH, T. J. On a new type of toxin produced by *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 53, p. 245-255, Nov. 1943.

BOWEN, H. E.; WYMAN, L. On the lack of agreement of the constant toxin and constant antitoxin flocculation reactions of diphtheria toxin and equine antitoxin. **Journal of Immunology**, v. 70, p. 235-244, Sep. 1953.

BRANDI, V. B. **Desenvolvimento e análises de validação de metodologias para o controle de processo de purificação e fabricação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo D**. 2007. 160 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, de 12 de maio de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.10168-10169, maio, seção 1, 1997.

BRITISH PHARMACOPEIA. Department of Health and Social Security. **Veterinary Vaccines**. Reino Unido: Medicines Commission, 1988.

BUXTON, D.; MORGAN, K. T. Studies of lesions produced in the brains of colostrums-deprived lambs by *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type D toxin. **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, p. 435-447, Feb. 1976.

BUXTON, D. Further studies on the mode of action of *Clostridium welchii* type

D epsilon toxin. **Journal Medical Microbiology**, v.11, p. 293-298, Mar.1978.

CARDOSO. Ética na experimentação animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. Cap. 3, p. 281-283.

COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; SCHMITZ, M.; GERMER, M.; NASCIMENTO, R. A. P.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; UZAL, F. A. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n.4, p. 173-178, out./dez. 2003.

DEAN, H. R.; WEBB, R. A. FLOCCULATION TEST. **Journal Pathology And Bacteriology**, v. 29, p. 473, Sep. 1926 *apud* SPAUN, J.; LYNG, J. Replacement of the international Standard for Tetanus Antitoxin and the use of Standard in the Flocculation Test. Bull. **Organisation Mondiale de La Santé**, v. 42, n.4, p. 523-534, Apr. 1970.

EBERT, E.; ÖPPLING, V.; WERNER, E.; CUSSLER, K. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of Clostridium perfringens Beta and Epsilon toxoid containing veterinary vaccines. **FEMS Immunology and microbiology**, v. 24, p. 299-311, Jan. 1991.

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, Apr. 1992a.

EL IDRISSEI, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 389-396, June. 1992b.

FAYEZ, M. M.; EL-MENISY, A. A., HUSSEIN, A. Z. In vitro estimation of potency of some clostridial toxoid. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 51 n. 105, p. 368-73 Oct. 2005.

FRANÇA, O. A. Ética na experimentação animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R.S. (Org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. Cap 3, p. 24-38.

GUN, J. V. D.; AKKERMANS, A.; HENDRIKSEN, C.; DONK, H. V. Validation of the toxin-binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the tetanus toxoid component in vaccines. **Developments in Biological Standardization Basel**, v. 86, p.199-206, May. 1996.

GUPTA, R. K.; SIBER. G. R. Comparative analysis of tetanus antitoxin titers of sera from immunized mice and guinea pigs determined by toxin neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Biologicals**, v. 22, p. 215-219, Sep. 1994.

HABEEB, A. F. S. A. Studies on epsilon protoxin of Clostridium perfringens

type D physicochemical and chemical properties of protoxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 412, p.62-69, Jul. 1975.

HAGENAARS, A.; VAN DELFT, R.; NAGEL, J. Comparison of ELISA and toxin neutralization test for determination of tetanus antibodies. **Journal of Immunoassay**, v. 5, p.1-11, May. 1984.

HATHEWAY, C. L.; JOHNSON, E. A. Clostridium: the spore-bearing anaerobes. In: COLLIER, L.; BALLOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. 9th ed. New York: Oxford University Press, 1998. Cap. 19, p. 731-782.

HAVARD, H. L.; HUNTER, S. E.; TITBALL, R. W. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of Clostridium perfringens type B and type D. **FEMS Microbiology Letters**, v. 76, n. 15 p. 77-81, Jul.1992.

HENDRIKSEN, C. F. M.; GUN, J. W. VAN DER; KREEFTENBERG, J. G. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro toxin-binding inhibition (ToBI) test. **Journal of Biological Standardization**, v. 17, p. 191-200, Apr. 1989.

HENDRIKSEN, C. F. M.; V. D. GUN, J. W.; NAGEL, J.; KREEFTENBERG, J. G. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. **Journal of Biological Standardization**, v. 16, p. 287-297, Oct. 1988.

HENDRIKSEN, C. F. M.; VAN DER GUN, J. W.; MARSMAN, F. R.; KREEFTENBERG, J. G. The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. **Biologicals**, v. 19, p. 23-29, Jan. 1991.

HOBBS, S. N.; MISRA, D. S.; SING, N. P. Studies on the pathogenesis of Clostridium perfringens type A serotypes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 48, n. 1, p. 42-47, Nov. 1978.

HSIEH, H. V.; STEWART, B.; HAUER, P.; HAALAND, P.; CAMPBELL, R. Measurement of Clostridium perfringens b-toxin production by surface plasmon resonance immunoassay. **Vaccine**, v. 16, n. 9-10, p. 997-1003, 1998.

IWAKI, M.; HORIUCHI, Y. KOMIYA, T.; FUKUDA, T.; ARAKAWA, Y.; TAKAHASHI, M. Toxoid Flocculation Assay by Laser Light-Scattering. **Journal of Immunological Methods**, v. 10, n. 318, p. 138-146, Jan. 2007,

JIN, F.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S. I.; JIN, S.; MATSUSHITA, C.; MINAMI, J.; OKABE, A. Purification, Characterization, and Primary Structure of Clostridium perfringens lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. **Infection and Immunology**, v. 64, n. 1, p. 230-237, Jul. 1996.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Moléstias causadas por bactérias. In:_____. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. Cap.7, p. 423-513.

KENNEDY, K. K.; NORRIS, S. J.; BECKENHAUER, W. H.; WHITE, R. G. Antitoxin response in cattle vaccinated with *Clostridium perfringens* type C toxoids. **Veterinary Medicine Small Animal Clinical**, v. 72, n. 7, p. 1213-1215, Jul. 1977.

KNIGHT, P. A.; QUEMINET, J.; BLANCHARD, J. H. In vitro tests for measurement of clostridial toxins toxoids and antisera. II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. **Biologicals**, v.18, p.263-270, Oct. 1990.

KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W.; HUNTER, P. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R.C. (Ed.) **Infectious Diseases of Livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford: Oxford University. 1994. v. 2, Cap. 29, p. 1315-1322.

LEVINE, L.; WYMAN, L. The Flocculation Test and the Law of Mass Action. **The Journal of Immunology**, v. 94, n. 4, p. 586-591, Apr. 1965.

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**, v. 3, n. 4, p. 201-217, Nov. 1993.

LOBATO, F.C.F., ASSIS, R. A. Controle e profilaxia das clostridioses. **A Hora Veterinária**, v. 19, n. 113, 2000.

LYNG, J.; BENTZON, M. W. The quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids 1 test the flocculation and the Lf-unit. **Journal of Biological Standardization**, v. 15, n. 1, p. 27-37, Jan. 1987,

MADDEN, D. L.; HORTON, R. E.; MCCULLOUGH, N. B. Spontaneous infection in ex-germ-free guinea pigs due to *Clostridium perfringens*. **Laboratory Animal Care**, v. 20, p. 454-455, Oct. 1970.

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunological**, v. 21, n. 3, p. 260-264, Sep. 1971.

MANGHI, M. A.; PASETTI, M. F.; BRERO, M. L.; DELUCHI, S.; DI PAOLA, G.; MATHET, V.; ERIKSSON, P. V. Development of an ELISA for measuring the activity of tetanus toxoid in vaccines and comparison with the toxin neutralization test in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 168, p. 17-24, Jan. 1994.

MARTIN, P. K.; NAYLOR, R. D.; SHARPE, P. T. Detection of Clostridium perfringens epsilon toxin by ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 44, p. 270-271, Mar. 1988.

MARTIN P. K., NAYLOR R. D. A Latex agglutination test for the qualitative detection of Clostridium perfringens epsilon toxin. **Research in Veterinary Science**, v. 56, p. 259-261, Mar. 1994.

MARUCCI, A. A.; FULLER, T. C. Quantitative microcomplement fixation test. *Appl. Microbiol.*, v. 21, n. 3 p. 260-264, Nov. 1971.

MATOS, D. C. S.; MARCOVISTZ, R.; CABELHO, P. H.; GEORGINI, R. A.; SAKAUCHI, D.; SILVA, L. L. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 909-913, set. 2002.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V.A.; AMARAL, V. L. L. Ética, bem-estar e legislação na experimentação animal. In: _____. **Animais de laboratório cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. Cap. 1, p.17-38.

MOZZER, O.M. **Cultivo em alta densidade do Clostridium botulinum tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias**. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – USP/IPT/Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MULLER; FRANCO. Ética na experimentação animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000.

NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S.; SAKURAI, J. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from Clostridium perfringens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 68, n. 1, p. 41-44, Nov. 1991.

NAYLOR, R. D.; MARTIN, P. K.; SHARPE, P. T. Detection of Clostridium perfringens epsilon toxin by ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 42, p. 255-256, Mar. 1987.

ODENDAAL M. W. Clostridium perfringens group, In: COETZER J. A. W., THOMSON G. R.; TUSTIN R. C. (Ed.) **Infectious Diseases of Livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford: Oxford University, 1994. v. 2. p. Cap.18, p.1290-1298.

ORLANS, E. S.; RICHARDS, C. B.; JONES, V. E. Clostridium welchii epsilon-toxin and antitoxin. **Immunology**, v. 3, p. 28-44, Jan. 1960.

PARREIRAS, P. M. **Padronização do teste de ELISA competitivo para detecção de anticorpos contra protoxina epsilon produzida pelo Clostridium perfringens**. 2001. 28 f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

PAYNE, D. W.; WILLIAMSON, E. D.; HAVARD, H.; MODI, N.; BROWN, J. **Evaluation of a new cytotoxicity assays for Clostridium perfringens type D epsilon toxin. FEMS Microbiology Letters**, v. 116, n. 6, p. 161-168, Feb. 1994.

RAMON, G. A propos du titrage in vitro du sérum antidiphthérique par la flocculation. **Compt Rend Soc Biol.**, v. 86, p. 813-815, Oct.1922.

RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. Cap. 3, p. 25-31.

ROSSKOPF-STREICHER, U.; VOLKERS, P.; WERNER, E. Control of Clostridium perfringens Vaccines using an Indirect Competitive ELISA for the Epsilon Toxin Component. **Pharmeuropa Bio**, v.3, n.2, p. 91-96, Jan. 2003.

ROY, K. S. R. R. M.; VENKATESWARLU, K. Incidence of infectious enterotoxaemia in goats in Andhra Pradesh. **Indian Veterinary Journal**, v. 6, p.806-807, Sep.1969.

RUSSELL, W. M. S.; BIRCH, R. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959 *apud* REMFRY, J. **Ethical aspects of animal experimentation laboratory animals: an introduction for new experimenters**. New York: Tuffery, 1987.

SAWIRES, Y. S.; SONGER, J. G. Clostridium perfringens: Insight into virulence evolution and population structure. **Anaerobe**, v. 12, p. 23-43, 2006.

SCHNAIDER, T. B; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n.2, p.278-285, Mar./Apr. 2003.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Digestive System. In: _____. **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p. 298-302.

SOJKA, M. G. WHITE, V. J.; THORNS, C. J.; *et al.* The detection of Clostridium perfringens epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody bas ELISA. **Journal of Biological Standardization**, v.17, p.117-124, Sep. 1989.

SOUZA JÚNIOR, M. F. **Teste de neutralização para toxina epsilon e titulação de toxinas beta e epsilon de Clostridium perfringens tipos C e D em cultura de células**. 2005. 56 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

SPAUN, J.; LYNG, J. Replacement of the international Standard for Tetanus Antitoxin and the use of Standard in the Flocculation Test Bull. **Organisation Mondiale De La Santé**, v. 42, n.4, p. 523-534, Apr.1970.

STILES, B. G.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of Clostridium perfringens iota-toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. **Infection and Immunology**, v. 54, n. 3, p. 683-688, Dec. 1986.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. In: **CODE of Federal Regulations**. Washington: United States Department of Agriculture, 2006. Part 113, p. 618-748.

UZAL, F. A.; KELLY, W.R. Enterotoxaemia in goats: a review. **Veterinary Research Communications**, v. 20, p. 481-492, June. 1996.

UZAL, F. A.; KELLY, W. I. Experimental Clostridium perfringens type D enterotoxemia in goats. **Veterinary Pathology**, v. 35, p.132-140, May.1998.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; THOMAS, R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F. Comparison of four techniques for the detection of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 16, p. 94-99, Oct. 2003.

UZAL, F. A.; GLASTONBURY, J. R. W.; KELLY, W. R.; THOMAS, R. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. **Veterinary Record**, v. 141, p. 224-226, Aug. 1997.

UZAL, F. A.; KELLY, W.R. & PARSONS, P.G. Enterotoxaemia in goats in Austrália Aust. **Veterinary Journal**, v. 76, n. 8, p. 543, Aug.1998a.

UZAL, F. A.; PASINI, M. I.; OLAECHEA, E. V.; ROBLES, C. A.; ELIZONDO, A. Na outbreak of enterotoxaemia caused by Clostridium perfringens in goats in Patagonia. **Veterinary Record**, v. 135, p. 279-280, Dec. 1994.

UZAL, F. A.; BODERO, D. A.; KELLY, W. R.; NIELSEN, K. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial Clostridium perfringens epsilon toxoid vaccine. **Veterinary Record**, v. 143, n. 17, p. 472-474, Oct. 1998.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; MORRIS, W. E.; ASSIS, R. A. Effects of intravenous injection of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 71-75, Jan. 2002.

VESCHI, J. L. A. **Avaliação sorológica de estratégias de imunoprofilaxia da enterotoxemia causada pela toxina epsilon de Clostridium perfringens tipo D em caprinos jovens**. 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

WALKER, P. D.; FOSTER, W. H.; KNIGHT, P. A.; FREESTONE, D. S.; LAWRENCE, G. Development, preparation and safety testing of a *Clostridium welchii* type C toxoid. I: preliminary observations in man in Papua New Guinea. **Journal of Biological Standardization**, v. 7, n. 4, p. 315-323, Jul. 1979.

WALORY, J.; GRZESIOWSKI, P.; HRYNIEWICZ, W. Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 245, p. 55-65, Jan. 2000.

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, Oct. 1991.

CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS SORONEUTRALIZAÇÃO EM CAMUNDONGO E ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTITOXINA EPSILON EM SOROS DE ANIMAIS IMUNIZADOS

RESUMO

Baseado em questionamentos sobre variabilidade dos resultados de testes que envolvem animais e, sobretudo, por razões éticas, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e padronizar o teste ELISA, para ser utilizado no controle de qualidade de vacinas contra enterotoxemia, em comparação ao teste de soro neutralização em camundongo. Utilizaram-se vacinas experimentais, as quais foram avaliadas por métodos *in vivo*, empregando-se o teste de soro neutralização em camundongo e *in vitro*, utilizando-se ELISA. Soros de coelhos e carneiros imunizados foram utilizados no desenvolvimento do trabalho. A titulação de antitoxina epsilon nos soros dos animais foi realizada, a partir de uma curva padrão, estabelecida previamente. Os reagentes utilizados foram devidamente padronizados para um valor de absorbância próximo de 1, numa faixa de 0 a 2 em comprimento de onda 492 nm. Os resultados obtidos apontaram para a ausência de correlação ($R < 1\%$), entre o ELISA e a soroneutralização em camundongos, para a titulação de antitoxina epsilon, presente em soro de coelhos imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes contra *Clostridium perfringens* tipo D. O coeficiente de variação intraplaca variou de 1,87 a 4,35%, para as vacinas polivalentes e de 0,11 a 6,61%, para as vacinas monovalentes. Os valores dos coeficientes de variação interplaca foram também pouco expressivos, não atingindo 2%, indicando alta homogeneidade nos resultados. Utilizando-se soro de carneiro, obteve-se coeficiente de correlação maior que 99%, confirmando relatos da literatura de que há similaridade entre o ELISA e soroneutralização em camundongo. Os coeficientes de variação inter e intraplaca se mostraram relativamente baixos, com valores variando entre 1,35 e 9,691 e de 1,44 a 7,29, respectivamente. Baseado no exposto, conclui-se que a metodologia *in vitro*, ELISA, é apropriada e indicada para a avaliação de potência de vacinas clostridiais, apenas quando se utiliza a porcentagem de inibição para calcular o título de antitoxina epsilon, a fim de reduzir a discrepância de resultados. Dessa forma, pode ser utilizada pelas empresas produtoras de vacinas e órgãos regulatórios como uma alternativa ao teste de soroneutralização, para a determinação de potência de vacinas, após ser submetida a um processo de validação adequado.

Palavras chave: Clostridioses. Metodologias *in vitro*. Ética animal. Teste de potência.

CHAPTER 2 - COMPARISON OF THE SERUM NEUTRALIZATION METHOD IN MOUSE WITH THE ELISA METHOD IN DETECTING EPSILON ANTITOXIN IN SERUM OF IMMUNIZED ANIMALS

ABSTRACT

Due to discussions about variability of the results of tests involving animals, and especially due to ethics matter, this study was carried out aiming at assessing and standardizing ELISA test so that it can be used in the quality control of vaccines against enterotoxemia comparing it to serum neutralization test in mice. Experimental vaccines were used; they were evaluated through *in vivo* method by utilizing serum neutralization test in mice, and *in vitro* through the use of ELISA test. Immunized rabbit and sheep serum were used along the development of the study. The titration of the epsilon antitoxin was performed from a curve pattern previously established, and the used reactants were properly standardized to an absorbance value around 1, at an espectrofometric range from 0 to 2 at a wavelength 492 nm. The results indicated a lack of correlation ($r < 1\%$) between ELISA and the serum neutralization in mice for a titration of epsilon antitoxin present in the serum of rabbits immunized with polyvalent and monovalent vaccines against *Clostridium perfringens* type D. Intraplate variation ratio ranged from 1.87 to 4.35% for polyvalent vaccines, and from 0.11 to 6.61% for monovalent vaccines. Intraplaque variation ratios were also little expressive – less than 2% – what indicates high homogeneity of the results. When using sheep serum, the correlation ratio was higher than 99%; this is according to literature review that reports similarity between ELISA and serum neutralization in mice. Inter and intraplate variation ratios were relatively low, varying from 1.35 to 9.961, and from 1.44 to 7.29 respectively. Therefore, it is concluded that the ELISA *in vitro* method is appropriate and indicated to assess clostridial vaccine potency only when using the percentage of inhibition to calculate the titration degree of epsilon antitoxin in order to reduce discrepancy in the results. Therefore, it may be used by vaccine industries and by regulator agencies as an alternative to serum neutralization tests that determine vaccine potency after it is subjected to an adequate validation process.

Key words: Clostridiosis. *In vitro* methods. Animal ethics. Potency test.

1 INTRODUÇÃO

A enterotoxemia é uma das enfermidades que causam o grande impacto econômico e sanitário nas criações de caprinos e ovinos, em todo o mundo. A vacinação, desde que realizada com vacinas comprovadamente eficientes, é a forma de profilaxia indicada para se evitar os prejuízos causados pelas doenças clostridiais, pois os animais estão sujeitos à infecção, em todas as etapas de sua vida produtiva (LOBATO *et al.*, 2000).

A utilização de imunógenos tem reduzido, em grande parte, a mortalidade e conseqüentes perdas econômicas relacionadas às clostridioses. Para Blackwell *et al.* (1992), a qualidade das vacinas é extremamente variável entre os países e laboratórios produtores, mostrando a necessidade de técnicas eficientes e viáveis para o controle de qualidade.

De acordo com Uzal *et al.* (1997), para compreender melhor a resposta imunológica de um animal à vacina contra o *C. perfringens* tipo D, é necessário um método simples, específico e sensível, que permita o processamento do soro de um grande número de animais. Normalmente, as técnicas empregadas para o controle desses toxóides são realizadas pela imunização de coelhos e os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos são determinados pelo bioensaio em camundongos, tornando-se um processo laborioso, além de gerar discussões bioéticas (EL IDRISI; WARD, 1992).

Muitos dos trabalhos descritos na literatura têm sido realizados, com o intuito de substituir o teste de neutralização de toxina em camundongos por ELISA. No entanto, têm surgido questionamentos acerca da metodologia, em decorrência da ausência de correlação com o método *in vivo*, quando se utilizam soros com níveis baixos de anticorpos (WOOD, 1991; HENDRIKSEN *et al.*, 1988; HAGENAARS *et al.*, 1984). No entanto, para contornar essa situação, Wood (1991) propõe o ELISA como um método alternativo satisfatório, para mensurar a potência de vacinas clostridiais, utilizando soro de coelhos imunizados, quando o nível de anticorpos no soro é relativamente alto.

Como descrito para o diagnóstico de enterotoxemia, os testes *in vitro*, particularmente o ensaio imunoenzimático, são reprodutíveis e podem ser

automatizados (UZAL *et al.*, 1997). A técnica 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 discussão ética sobre o uso de animais em testes laboratoriais, também ocorre sobre o teste de potência de vacinas, realizado por meio da soroneutralização em camundongos.

A potência de vacinas pode ser avaliada por diferentes processos, tais como a enumeração de organismos viáveis ou por meio da dosagem de proteínas no inóculo, antes da inativação e adição de adjuvante. Há a necessidade de um teste de potência, antes de o lote ser liberado e que permita a análise do produto também, quando disponível no mercado (LEVINGS *et al.*, 1993). Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar e padronizar a técnica imunoenzimática ELISA e compará-la com a soroneutralização em camundongos, na titulação de anticorpos vacinais, frente ao toxóide epsilon.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 vacinas experimentais, produzidas pelo Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A., em Montes Claros-Minas Gerais, que continham, em sua composição, o toxóide produzido pelo *Clostridium perfringens* tipo D e um adjuvante aquoso. Dentre as vacinas utilizadas, cinco eram polivalentes, constituídas de diferentes combinações de toxóide de *C. perfringens* tipo C, *C. perfringens* tipo D, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novyi* e bacterina do *C. chauvoei* (TABELA 1), e cinco monovalentes, constituídas de toxóide de *C. perfringens* tipo D, mais um adjuvante aquoso.

TABELA 1

Composição antigênica das vacinas clostridiais polivalentes, utilizadas na avaliação das metodologias *in vitro* e *in vivo*, destinadas à análise de soro de animais imunizados

Vacina Experimental	Composição antigênica							
	CPD	CPC	CBD	CBC	CHA	SEP	SOR	NOV
1	X	X	X	X	X	-	-	-
2	X	X	X	X	X	-	-	-
3	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X

CPD = *Clostridium perfringens* tipo D CPC = *Clostridium perfringens* tipo C
 CBD = *Clostridium botulinum* tipo D CBC = *Clostridium perfringens* tipo C
 CHA = *Clostridium chauvoei* SEP = *Clostridium septicum*
 SOR = *Clostridium sordellii* NOV = *Clostridium novyi*

As vacinas se diferenciaram pela composição de antígeno da fórmula de cada uma e tipo de adjuvante utilizado, sendo a concentração de adjuvante mantida constante em todas as vacinas.

Foi utilizado o 2º padrão internacional para a anti toxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (2CpEpsilonAt) NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*). A toxina epsilon de *Clostridium perfringens*

tipo D; produzida em meio sugerido por Brandi (2000), a 37°C, 200 rpm, por 15 horas; foi padronizada ao nível de teste L+/10, que é a menor quantidade de toxina que frente a 0,1 UI de antitoxina padrão homóloga, causa morte em pelo menos 80% dos camundongos inoculados (UNITED STATES, 2006).

As toxinas foram clarificadas por sistema de filtração tangencial e, em seguida, concentradas por ultrafiltração, sendo, posteriormente, submetidas ao processo de inativação, utilizando-se formol a 37%. Após esse processo de destoxificação, as suspensões foram denominadas de toxóides. As diferentes suspensões de toxóide epsilon, produzidas a partir do *Clostridium perfringens* tipo D, bem como os soros de coelhos padronizados foram preparados e cedidos pelo Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A.

As placas de poliestireno e as placas de imunoensaio, bem como a solução de lavagem (solução de NaCl 0,9% p/v contendo 0,05% de Tween-20), conjugado anti-soro de coelho de marca SIGMA[®], substrato enzimático ortofenilenodiamino (0,4mg/mL) com peróxido de hidrogênio 30 volumes (0,2 µL/mL), preparado em solução tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e solução 2M H₂SO₄ foram fornecidos pela Vallée S.A.

Foram utilizados coelhos, de ambos os sexos, de três a seis meses de idade e peso entre dois e quatro kg, camundongos albinos Swiss (17 a 22 g) de ambos os sexos, oriundos do biotério de P&D da Vallée S.A. Carneiros da raça Santa Inês foram provenientes da Fazenda Experimental da Vallée S.A, na cidade de Uberlândia-Minas Gerais.

Coelhos, fornecidos pela Fazenda Experimental da UFMG (Igarapé – MG), foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável (30 x 12 x 19 cm) desde o período de quarentena (20 dias) até o término do experimento.

Os camundongos foram alojados em gaiolas de polipropileno, com tampa de aço inoxidável (30 x 19 x 12 cm) e cama de maravalha de pinus e aclimatados por 24 horas antes do início do experimento.

Os carneiros foram mantidos em galpões de alvenaria, sendo liberados duas horas por dia no pasto andropogon (*Andropogon gayanus* cv. *Planaltina*).

Todos os animais receberam água e ração comercial (Agroceres saúde

animal[®], Rio Claro, São Paulo), específica para cada espécie, *ad libitum*. Tanto os camundongos quanto os coelhos foram mantidos no biotério/infectório da Vallée S. A., com os seguintes controles experimentais: temperatura (20 +/- 2° C), umidade relativa do ar e m aproximadamente 70% e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. As trocas de cama foram realizadas três vezes por semana e a ração, substituída, semanalmente.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CETEA – UFMG), sob Protocolo nº 183/07. Todos os resíduos gerados por animais foram devidamente incinerados por empresas credenciadas para essa atividade.

2.1 Imunização de animais para a produção de soros

A imunização dos coelhos foi realizada, conforme descrito no UNITED STATES (2006). Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 8 animais, sendo cada grupo imunizado com uma vacina diferente. Os animais foram imunizados com duas doses de vacina, em intervalos de 21 dias, por via subcutânea, sendo o volume injetado de 2,5 mL. Foi coletado sangue dos animais, puncionando a veia central da orelha, 35 dias após a primovacinação. O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm, por 10 min na centrífuga Fanem^{®1} e o soro, separado em um frasco de 10 mL. Quantidades iguais dos soros de cada coelho foram misturadas, obtendo-se um *pool*, o qual foi armazenado à temperatura de -20°C até a utilização.

A imunização dos carneiros foi realizada, segundo Bier (1955), com as seguintes modificações: três carneiros com quatro meses de idade foram vacinados na região do pescoço, após a realização de tricotomia e assepsia, com álcool iodado, com dose de 2,0 mL via subcutânea. Foram realizadas sete aplicações, conforme TABELA 2, para estimular a produção de

¹ Centrífuga Fanem[®] - Centrífuga de Bancada Baby[®] Modelo 206 BL

anticorpos. As duas primeiras doses, com toxóide inativado e as demais, com toxina padrão ativa. A partir do 35º dia, foram realizadas cinco sangrias dos animais imunizados, por punção da veia jugular, a cada 14 dias, para titulação e monitoramento da produção de anticorpos.

Para aferir a potência dos soros de cada um dos animais, foi realizada uma comparação com uma antitoxina padrão, contendo 2 UI/mL, adquirida do órgão internacional NIBSC. Dessa forma, a dose de soro necessária para proteger os camundongos, inoculados com uma quantidade fixa de toxina epsilon, foi comparada com a dose da antitoxina padrão, que protegia os animais previamente inoculados com uma mesma dose de toxina padrão homóloga (TIZARD, 2002), utilizando-se um nível de desafio igual a L+/10.

TABELA 2

Esquema de imunização de carneiros com toxóide e toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D

Esquema de inoculação	Dose Desafio	Dia Sangria	Adjuvante
Vacinação	-	zero	Hidróxido de alumínio
Revacinação	-	21	Hidróxido de alumínio
1ª dose	2 DL ₅₀	35	Completo de Freud
2ª dose	2 DL ₅₀	49	Incompleto de Freud
3ª dose	2,5 DL ₅₀	63	Incompleto de Freud
4ª dose	2,5 DL ₅₀	77	Incompleto de Freud
5ª dose	5 DL ₅₀	81	Incompleto de Freud

Os soros utilizados na realização das metodologias *in vivo* e *in vitro* para a quantificação de anticorpos foram coletados nos dias 35, 49, 63, 77 e 81 após a primovacinação, sendo identificados como S1, S2, S3, S4 e S5, respectivamente.

2.2 Teste de soroneutralização em camundongo

A soroneutralização em camundongo foi realizada, segundo a metodologia descrita pelo UNITED STATES (2006), com devidas adaptações para este trabalho.

O soro teste de coelho ou carneiro imunizado, utilizado puro e diluído, com salina peptonada, composta de 10,0 g.L⁻¹ de peptona, 2,5 g.L⁻¹ de NaCl e pH 7,2, nas diluições 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50.

A toxina epsilon padronizada de *Clostridium perfringens* foi diluída de duas formas, de modo a se obter uma toxina contendo 10L+/10/mL e outra 10L0/10/mL, conceituada como a maior quantidade de toxina que, frente a 0,1 UI de antitoxina padrão homóloga, não causa morte ou doença nos animais inoculados. Um mL de cada uma das diluições do soro teste foi acrescido de 1 mL da toxina contendo 10L+/10/mL. O mesmo procedimento foi realizado com a toxina contendo 10L0/10/mL.

Após o tempo de reação de 30 min. a 37°C em banho-maria, foram inoculados 0,2 mL da mistura toxina + soro teste em cinco camundongos por diluição, por via endovenosa na cauda.

Os animais do grupo controle foram inoculados com 0,2 mL de antitoxina padrão específica (NIBSC), contendo 2 UI/mL, em substituição ao soro teste, acrescidos de toxinas contendo 10L+/10/mL e 10L0/10/mL, seguindo o mesmo procedimento adotado para o soro teste.

A interpretação dos resultados foi baseada na primeira diluição onde ocorreu morte e na última diluição onde os camundongos sobreviveram para as doses L+ e L0, respectivamente.

2.3 Titulação de antitoxina epsilon, presente no soro teste de coelhos e carneiros, imunizados contra *Clostridium perfringens* tipo D, por meio do método *in vitro* – ELISA Competitivo modificado

A padronização de antígeno, de anticorpo de coelho anti-epsilon toxina e de conjugado anti-soro de coelho utilizados no teste ELISA competitivo se encontra descrita no item 2.3.1.

2.3.1 Procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho anti-epsilon toxina e de conjugado anti-soro de coelho, utilizados no teste ELISA competitivo

A padronização dos reagentes foi realizada, conforme Uzal *et al.* (1997), com devidas adaptações para este trabalho. Primeiramente, avaliaram-se as seguintes diluições de antígenos e anticorpos, a fim de selecionar as diluições que permitissem absorbância próxima de 1, numa faixa de 0 a 2 a 492 nm e, assim, utilizá-los nas etapas subseqüentes deste trabalho. O antígeno, toxina padronizada contendo 2560 L+/10/mL na titulação *in vivo*, utilizando-se camundongos, foi preparado puro e nas diluições 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 e 1:2560. O anticorpo, soro de coelho imunizado com vacina anti-epsilon contendo 5 UI/mL na soroneutralização *in vivo*, foi utilizado puro e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:160.

O conjugado anti-soro de coelho de marca SIGMA® foi utilizado na diluição 1:20.000, conforme recomendação do fabricante.

Utilizou-se uma placa para a toxina pura e para cada diluição da toxina, acrescentando-se 100 µL da toxina padronizada diluída em tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato (0,05M e pH 9,6) em cada orifício da placa. Após a incubação a 4 °C por 12 horas e a lavagem, com solução de cloreto de sódio e tween, bloqueou-se cada orifício da placa, com 200 µL de solução de albumina 3% e reincubou-se a 37 °C por 60 min. Após nova lavagem com a solução de lavagem, adicionaram-se 100 µL de anticorpo anti-epsilon de soro de coelho, sendo que, em cada linha da placa, foi colocada uma diluição do soro de coelho, até a coluna oito da placa. As diluições 1:128 e 1:160 foram colocadas na penúltima e última colunas, respectivamente. Depois de incubar a 37 °C por 60 min. e lavar, adicionaram-se 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho e incubou-se a 37 °C por 60 min. Por fim, adicionou-se 100 µL do substrato enzimático, preparado dissolvendo 10 mg de OPD (orto-fenilenodiamino) em 25 mL de tampão citrato (0,15M e pH 5), acrescido de 12,5 µL de peróxido de hidrogênio (1:1150 partindo da amostra pura). Incubou-se a 37 °C por 60 min

adicionando, em seguida, 20 µL de ácido sulfúrico (1:20 partindo da amostra pura). Esse substrato foi preparado no momento do uso.

No controle do conjugado, foi realizado na última linha da placa, desenvolvendo todas as etapas descritas anteriormente, exceto a adição de anticorpo de coelho (UZAL *et al.*, 1997).

Os resultados da prova foram obtidos, baseando-se nos valores de absorbância, a 492 nm, fornecidos pelo aparelho espectrofotômetro Ultrospec 2000^{®2}.

Os reagentes padronizados foram utilizados tanto na realização do ELISA competitivo, utilizando soro de coelho, quanto utilizando soro de carneiro.

2.3.2 Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo para a análise de soro de coelho imunizado

A curva padrão foi baseada no recomendado por Uzal *et al.* (1997), com as seguintes modificações: as placas foram sensibilizadas com 100 µL de toxina epsilon padronizada, na concentração previamente estabelecida (10L+/10/mL). Soro de coelho nas concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 UI/mL foram adicionados à placa, sendo que cada linha da placa recebeu uma diluição de soro de coelho até a coluna 8. As colunas 11 e 12 foram preenchidas com a concentração 0,078 UI/mL e com o controle negativo, respectivamente. Depois de incubar a 37 °C por 60 min. e lavar, adicionaram-se 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho e incubou-se a 37 °C por 60 min. O substrato utilizado e a leitura dos valores de absorbância foram obtidos, conforme descrito no item 2.3.1. Os ensaios foram repetidos oito vezes em uma mesma placa. Cada repetição realizada em uma coluna da placa.

² Ultrospec 2000[®] - CGS 8162.39 Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer

2.3.3 ELISA competitivo, utilizando soro de coelho imunizado

A placa de diluição foi bloqueada, adicionando-se 250 µL solução de albumina 3%, deixando-a incubada a 37°C, por 60 min. Após lavagem, realizou-se diluição seriada do soro teste, utilizando-se o fator dois. Foram acrescentados 100 µL de toxina padrão, diluída 256 vezes e, após agitação, a placa foi incubada a 37 °C, em atmosfera úmida, por 60 min.

Na etapa de sensibilização, a placa foi sensibilizada com 100 µL da toxina padronizada, diluída 256 vezes, com tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato. A diluição utilizada foi estabelecida previamente no item 2.3.1. Após 12 horas de incubação a 4 °C e lavagem, bloqueou-se cada orifício da placa com 200 µL de solução de albumina 3%, incubando a 37 °C, por 60 min. Após nova lavagem, foram adicionados 100 µL da mistura soro teste e toxina diluída, incubando a 37 °C, por 60 min e foram adicionados 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho, diluído com tampão de diluição, incubando-se novamente a 37 °C, por 60 min. Finalmente, após lavagem, adicionaram-se 100 µL do substrato enzimático (OPD), preparado conforme item 2.3.1. e a leitura foi obtida, conforme descrito nesse mesmo item.

O procedimento com cada um dos soros teste foi repetido 12 vezes na mesma placa e em 2 placas distintas, porém de mesmo lote.

2.3.4 Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo para a análise de soro de carneiro imunizado

A análise do soro anti-epsilon, proveniente de carneiro imunizado foi realizada com base na porcentagem de inibição, uma vez que a leitura da absorbância foi determinada por um conjugado anticoelho.

Para a elaboração da curva padrão, a placa foi sensibilizada, adicionando-se 100 µL de toxina epsilon, na concentração de 10L+/10/mL. Acrescentaram-se 50 µL antitoxina epsilon padrão NIBSC, contendo 5,1; 2,55; 1,275; 0,213; 0,053 e 0,027 UI/mL em cada linha da placa. Junto a cada uma das concentrações de antitoxina padrão, foram colocados 50 µL de soro de coelho anti-epsilon toxina, utilizando-se 50% da diluição previamente

padronizada. Dessa forma, a antitoxina padrão e o soro de coelho anti-epsilon toxina competiam pela toxina epsilon, adsorvida na placa.

Em cada placa utilizada, foram realizados dois controles a saber:

Controle 0% de inibição: na penúltima linha da placa apenas colocou-se o soro de coelho sem a antitoxina padrão.

Controle 100% de inibição: na última linha apenas colocaram-se as diluições da antitoxina padrão sem a adição de soro de coelho, sendo esse o ponto de menor diluição da antitoxina epsilon padrão.

O quanto a antitoxina epsilon padrão NIBSC inibia a ligação anticorpo do soro de coelho à toxina epsilon padrão adsorvida na placa foi expresso em porcentagem de inibição e, a partir desses valores, elaborou-se a curva padrão, correlacionando essa porcentagem de inibição com a potência em unidades internacionais (UI/mL) do soro padrão (UZAL *et al.*, 1997). O ensaio foi realizado oito vezes em uma mesma placa. Na interpretação dos resultados foram sempre considerados os controles zero e 100% de inibição da ligação do anticorpo do soro de coelho com a toxina epsilon adsorvida na placa. A porcentagem de inibição, utilizando-se números relativos (UZAL *et al.*, 1997), foi calculada, conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{t \times 100}{z}$$

Onde:

x = 0% de inibição

y = 100% de inibição

t = x – absorbância do soro teste

z = x – y

2.3.5 ELISA competitivo, utilizando soro de carneiro imunizado

O ELISA foi realizado, segundo Uzal (1997). Foram testados cinco diferentes soros de carneiros, identificados seqüencialmente de S1 a S5. O procedimento para cada soro teste foi repetido 12 vezes na mesma placa e em quatro placas distintas de mesmo lote, para avaliação da variabilidade do teste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Titulação de antitoxina epsilon, em soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra *Clostridium perfringens* tipo D, por meio dos métodos *in vivo* e *in vitro*

Na TABELA 3, estão apresentados os títulos de antitoxina epsilon, presentes nos soros de coelhos, imunizados com as vacinas experimentais polivalentes e monovalentes, respectivamente, que contêm, na composição, diferentes proporções de toxóide epsilon de *C. perfringens* tipo D.

O soro controle proveniente do NIBSC, com título de antitoxina epsilon conhecido (2 UI/mL), apresentou resultado condizente com o esperado, atestando a validade da prova.

As vacinas, com exceção das vacinas experimentais 2 e 9, induziram respostas satisfatórias de antitoxina epsilon de *C. perfringens* tipo D em coelhos, cujos títulos foram iguais ou superiores ao título mínimo exigido de 2 UI/mL, para a aprovação da vacina (UNITED STATES, 2006). As diferenças de resultados entre as vacinas utilizadas no atual trabalho se devem à presença de diferentes adjuvantes, bem como à quantidade de imunógeno epsilon adicionada a cada uma das formulações, o que fez com que os animais respondessem imunologicamente com diferentes intensidades. Sabe-se que as amostras sementes utilizadas, a composição dos meios de cultura, pH, tempo, temperatura e atmosfera de incubação são fatores importantes e devem ser rigorosamente controlados para uma efetiva produção de vacina, culminando em vacinas de qualidade adequada. Apesar disso, neste estudo não foi feito desafio de animais com esporos de *C. perfringens* tipo D, teste mais indicado para avaliar a capacidade protetora do antígeno somático.

Os resultados das vacinas experimentais 2 e 9 foram importantes, pois foi possível comparar vacinas aprovadas e reprovadas pelo teste de soroneutralização em camundongos e testes *in vitro*. Também no trabalho realizado por Ebert *et al.* (1999), vacinas com diferentes potências foram utilizadas, a fim de avaliar a capacidade do teste ELISA em discriminar níveis

variados de antitoxina no soro de coelhos imunizados, podendo-se comparar esses níveis com os títulos obtidos na soroneutralização.

Lobato e Assis (2000) também encontraram resultados variados para uma série de vacinas testadas para a toxina epsilon, sendo os valores de 5,6 e 7,0 UI/mL para duas das vacinas analisadas. Por outro lado, de seis vacinas testadas por Azevedo *et al.* (1998), nenhuma delas foi capaz de induzir resposta imunológica em coelhos superior a 5 UI/mL. Dessa forma, percebe-se a necessidade de se estabelecer metodologias *in vitro* que sejam sensíveis para detectar baixos níveis de antitoxinas no soro de animais imunizados, uma vez que muitas das vacinas contra clostridioses são capazes de estimular níveis mínimos de antitoxina epsilon.

Roskopf-Streicher *et al.* (2003) utilizaram o ELISA competitivo, para quantificar antitoxina epsilon de *C. perfringens* tipo D, em soro de coelho. A maioria das vacinas utilizadas no referido trabalho estimulou respostas imunológicas próximas a 10 UI/mL e uma das vacinas apresentou título de 38 UI/mL. No entanto, nenhuma vacina demonstrou potência abaixo de 5UI/mL. Os autores relataram a necessidade de se utilizar vacinas de baixa potência nas análises de validação, para avaliar a sensibilidade da técnica em estudo.

No estudo realizado por Ebert *et al.* (1999), as monovacinas de *C. perfringens* tipo C, utilizadas para estimular níveis de anticorpos em coelhos, apresentaram potências iguais a 8,23; 6,4 e 15,8 UI/mL. Esses autores concluíram que os valores de títulos elevados encontrados no referido trabalho podem estar associados a fatores inerentes à formulação da vacina, tais como: concentração de antígeno por dose, tipo de adjuvante e qualidade da cepa utilizada para a produção do antígeno. Assim, em decorrência da diversidade de vacinas contra clostridioses existentes no mercado brasileiro, provenientes de diferentes indústrias, os resultados variados de potência de vacinas clostridiais, encontrados no presente trabalho, foram interessantes, por possibilitarem a avaliação da eficiência da metodologia *in vitro* em estimar potência de vacinas, com diferentes qualidades.

A produção de anticorpos durante a imunização dos carneiros foi verificada a cada etapa de inoculação da vacina e de toxina. Na TABELA 4, estão apresentados os títulos de antitoxina epsilon, presente nos soros de

carneiros imunizados com as vacinas experimentais monovalentes, seguida de doses crescentes de toxina epsilon. Os títulos de anticorpos aumentaram conforme o esperado, devido ao aumento da concentração de antígeno, a cada inoculação.

Verificou-se que o título de anticorpos variou de 2 a 10 UI/mL, sendo que os valores aumentaram na medida em que se aumentava a carga imunogênica inoculada nos animais. Esse aumento na titulação de anticorpos também foi observado por Parreiras (2001), quando foram analisados soros provenientes de sangrias realizadas 10 dias após a dose de reforço e 10 dias após a 4ª imunização dos carneiros, o que é explicado imunologicamente pelo efeito *booster* de revacinações (TIZARD, 2002).

3.1.1 Padronização de antígeno, anticorpo de coelho e conjugado anti-soro de coelho, utilizados no teste ELISA competitivo

A toxina epsilon com 2560 L+/10/mL diluída 1:256 mostrou ser suficiente para sensibilizar as placas e a imunoglobulina de cabra antiimunoglobulina de coelho, conjugada à peroxidase foi utilizada na diluição 1:20000, conforme recomendação do fabricante, mostrando-se também suficiente para as reações de ligação com a imunoglobulina de coelho.

A imunoglobulina de coelho com 5 UI/mL, testada nas diluições pura, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:160, foi padronizada para ser utilizada no ELISA competitivo na diluição 1:16, uma vez que essa diluição apresentou absorbância próxima de 1 a 492 nm na faixa linear da curva, conforme pode ser verificado na FIGURA 1 (A e B), que representa a curva de imunoglobulina anti-epsilon de coelho.

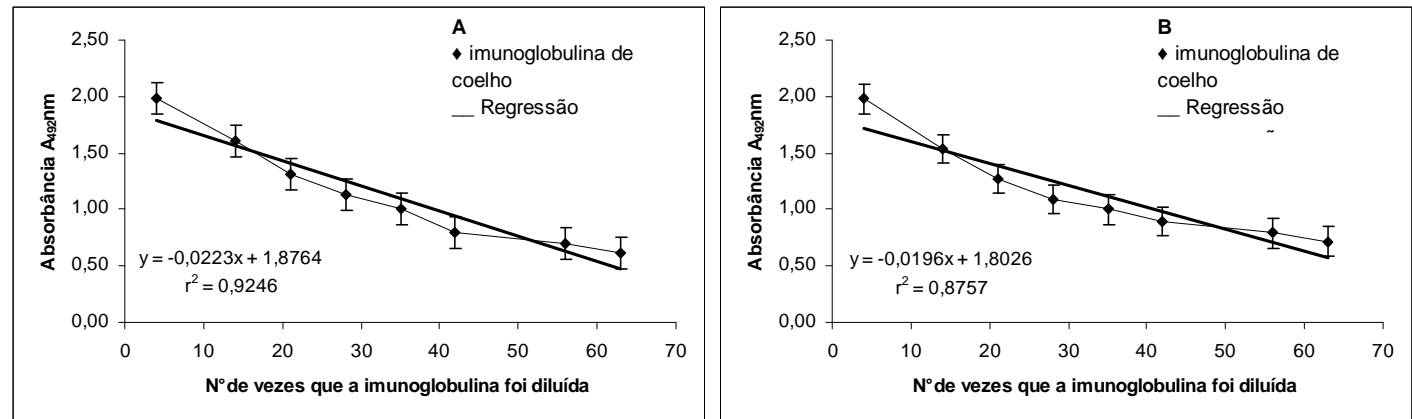


FIGURA 1 – Curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho utilizada no teste ELISA, que mostra a correlação entre os valores de absorbância (492 nm) e a concentração de imunoglobulina presente no soro de coelho, bem como a curva de regressão linear da análise e o desvio padrão em cada ponto mensurado. Em (B), estão representadas as mesmas análises que foram realizadas em (A).

No trabalho realizado por Rosskopf-Streicher *et al.* (2003), encontraram-se as diluições de 1:16 a 1:126 na parte linear da curva. Entretanto, Parreiras (2001) encontrou a diluição 1:900 como sendo a que se localiza na faixa linear da curva, apresentando absorvância igual a 1 a 492 nm. As diluições diferentes encontradas podem ser atribuídas à diferença na quantidade de imunoglobulinas presentes nos soros de coelhos testados. Além do mais, a diferença entre os reagentes utilizados e padronização de teste distintas influenciam em muito nos resultados.

Dados da literatura relatam que as placas de poliestireno, utilizadas neste trabalho, apresentam variação na capacidade absorviva entre os distintos lotes de placas de um mesmo fabricante (LEVINGS *et al.*, 1993). Assim, para a confirmação dos resultados representados pela curva da FIGURA 1 (A), uma nova placa de 96 poços, de mesmo lote da anterior, foi sensibilizada em dia diferente da anterior e ensaiou-se o mesmo soro de coelho nas mesmas diluições. A repetição da curva da imunoglobulina anti-epsilon está apresentada na FIGURA 1 (B), comprovando-se os resultados apresentados na curva da FIGURA 1 (A), ou seja, a diluição 1:16 do soro de coelho permitiu absorvância próxima de 1 a 492 nm na faixa linear da curva.

3.1.2 Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo para titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de coelhos imunizados

A FIGURA 2 ilustra os valores de absorvância ($A_{492\text{nm}}$), a média obtida, a partir do ensaio de oito repetições, com seus respectivos títulos de anticorpos em logaritmo neperiano (Ln). Observa-se a coerência dos resultados, uma vez que a absorvância diminui proporcionalmente à queda no título de antitoxina epsilon. O controle negativo apresentou resultado condizente com o esperado, atestando a validade da prova. A curva padrão, obtida por regressão linear simples, mostra o coeficiente de correlação entre os valores da absorvância ($A_{492\text{nm}}$) do ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina epsilon de soro de coelho de 99,07%, superior aos valores encontrados por Uzal *et al.* (1997) e Sojka *et*

al. (1989), que foram de 98 e 96%, respectivamente. O coeficiente de correlação elevado permite maior segurança e confiabilidade nos resultados da titulação dos soros testados, a partir da curva (PARREIRAS, 2001).

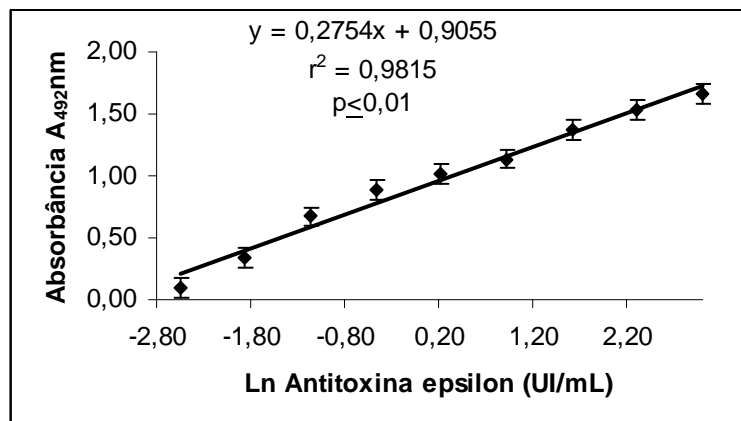


FIGURA 2 – Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorvância ($A_{492\text{nm}}$) no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL de antitoxina epsilon de soro de coelho.

3.1.3 Verificação da aplicação do teste ELISA Competitivo, avaliando-se soros de coelhos, imunizados com vacinas anti-clostridiose

A TABELA 3 mostra os títulos de antitoxina epsilon, presentes em cada soro de coelho testado e os respectivos valores médios de absorvância ($A_{492\text{nm}}$). Na TABELA 4, estão apresentados os coeficientes de variação intra e interplacas.

TABELA 3

Títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) em logaritmo neperiano, em soros de coelhos imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes, pelo método ELISA competitivo nas placas 1 e 2

Vacina Experimental	Média A ₄₉₂ nm	Ln UI/mL	UI/mL	Ln UI/mL	UI/mL	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	DP (δ)
<i>in vitro</i> - Placa 1				<i>in vivo</i>			
1	0,206	-2,541	0,078	1,386	4	0,020	0,036
2	0,154	-2,730	0,065	0,000	1	0,065	0,053
3	0,193	-2,587	0,075	1,386	4	0,019	0,030
4	0,157	-2,720	0,065	0,693	2	0,033	0,041
5	0,177	-2,645	0,071	1,099	3	0,024	0,046
Média	0,177	-2,645	0,071	0,913	2,8	0,025	0,041
<i>in vitro</i> - Placa 2				<i>in vivo</i>			
6	0,367	-1,957	0,141	1,609	5	0,028	0,051
7	0,389	-1,874	0,153	2,303	10	0,015	0,048
8	0,421	-1,760	0,172	2,303	10	0,017	0,054
9	0,129	-2,820	0,059	0,000	1	0,059	0,044
10	0,314	-2,150	0,116	1,099	3	0,039	0,020
Média	0,324	-2,112	0,128	1,463	5,8	0,022	0,040
<i>in vitro</i> - Placa 2				<i>in vivo</i>			
1	0,213	-2,515	0,080	1,386	4	0,020	0,036
2	0,160	-2,707	0,066	0,000	1	0,066	0,052
3	0,199	-2,565	0,077	1,386	4	0,019	0,029
4	0,162	-2,701	0,067	0,693	2	0,034	0,039
5	0,184	-2,619	0,072	1,099	3	0,024	0,045
Média	0,184	-2,621	0,072	0,913	2,8	0,026	0,043
6	0,369	-1,949	0,142	1,609	5	0,028	0,053
7	0,393	-1,860	0,155	2,303	10	0,016	0,049
8	0,400	-1,835	0,159	2,303	10	0,016	0,055
9	0,130	-2,816	0,059	0,000	1	0,059	0,057
10	0,315	-2,146	0,117	1,099	3	0,039	0,020
Média	0,321	-2,121	0,126	1,463	5,8	0,022	0,046

1 a 5 = vacinas experimentais polivalentes

6 a 10 = vacinas experimentais monovalentes

Os resultados dos títulos de antitoxina epsilon (UI/mL) estão condizentes com o esperado, uma vez que os valores de absorbância são proporcionais aos títulos de antitoxina epsilon. No entanto, verificou-se que, com nenhuma das vacinas, o título de antitoxina epsilon atingiu 1 UI/mL, contrapondo-se aos resultados obtidos na soroneutralização. Pelo princípio básico do teste ELISA, esperava-se que o título de antitoxina epsilon no ELISA fosse maior que o título obtido na soroneutralização porque o ELISA é uma ligação específica anticorpo e antígeno, mas que não diferencia anticorpos de diferentes qualidades, por exemplo, anticorpo neutralizante de não neutralizante e o teste de neutralização de toxina em camundongo, por sua vez, mensura apenas anticorpos protetores (WOOD, 1991). No entanto, não foi o caso deste trabalho, cujos achados corroboram os resultados de Wood (1991), que encontrou um coeficiente de correlação de 0,93 entre a soroneutralização em camundongo e ELISA. Explica-se esse fato pela utilização de reagentes não purificados, em que ocorre a predominância de anticorpos não específicos presentes nas amostras testadas e baixa habilidade de ligação entre os anticorpos dos soros testados e a toxina adsorvida na placa (HENDRIKSEN *et al.*, 1988).

Observou-se, ainda, que os títulos de antitoxinas proporcionados pelas monovacinas foram maiores que pelas polivacinas, sugerindo interferência de outros anticorpos nas análises de antitoxina epsilon, uma vez que a concentração de antígeno epsilon foi similar entre as vacinas polivalentes e monovalentes. Essa diferença de títulos observada entre as vacinas polivalentes e monovalentes é perceptível no teste de soroneutralização, utilizando camundongo (TABELA 3) e está relacionada com a competição imunológica entre os antígenos das vacinas polivalentes. A única exceção foi o resultado da vacina 9, que apresentou resultado inferior à vacina polivalente correspondente. Esse fato está relacionado à habilidade individual dos animais de responderem imunologicamente às vacinas clostridiais.

TABELA 4

Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina de coelho, presentes em soros de coelhos, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes

Vacina Experimental	CV (%)	
	Intraplaca	Interplaca
1	1,869	1,423
2	4,441	1,444
3	2,432	1,422
4	2,297	1,432
5	4,349	1,439
6	6,609	1,450
7	0,142	1,383
8	0,106	1,380
9	1,869	1,423
10	4,441	1,444

1 a 5 – Vacinas polivalentes
6 a 10 – Vacinas monovalentes

O coeficiente de variação intraplaca ficou entre 1,869 e 4,349%, para as vacinas polivalentes e entre 0,106 e 6,609%, para as vacinas monovalentes. Por outro lado, a variação interplaca apresentou menor intensidade, não atingindo 2%, não existindo diferença estatística significativa pelo teste F a 1% de probabilidade. Esses resultados diferiram dos resultados obtidos por Sojka *et al.* (1989), visto que esses autores encontraram maiores variações interplaca, ficando os valores entre 2,5 e 6,8%, para o coeficiente de variação interplaca e entre 0,2 e 2,0, para a variação dentro da mesma placa. A reprodutibilidade do ELISA de captura, no trabalho realizado por Ebert *et al.* (1999), ao utilizarem monovacinas de *C. perfringens* tipo C, apresentou coeficiente de variação de 1 a 2%, para os ensaios intraplaca e de 4 a 30%, para os ensaios interplaca, os quais atingiram valores maiores que os obtidos no presente trabalho, principalmente para os coeficientes de

variação interplaca. É certo que os resultados obtidos pela metodologia ELISA dependem muito do operador, da qualidade dos reagentes e das placas utilizados e mesmo dos equipamentos adotados para o procedimento de lavagem.

Maiores valores de coeficiente de variação no presente trabalho observados intraplaca podem ser atribuídos à forma como os soros foram pipetados em cada placa. Além do mais, as duas placas foram montadas em um mesmo dia e pelo mesmo técnico, podendo o coeficiente de variação ser alterado quando a análise for realizada em dias diferentes e por diferentes operadores.

Dados da literatura relatam que o coeficiente de variação intraplaca do teste ELISA não excede 10% e coeficiente de variação interplaca não excede 30% (TIJSSEN, 1985), que são valores superiores aos encontrados no referido trabalho.

Assim, os coeficientes de variação encontrados neste trabalho se apresentam satisfatórios, implicando em que o teste foi uniforme, com pouca discrepância entre os resultados. Dessa forma, para se precaver das variações existentes entre os testes ELISA, recomenda-se que as vacinas testadas por essa técnica apresentem resultados 4,349 e 6,609% acima do valor de 2 UI/mL recomendado pelo UNITED STATES (2006), para as vacinas polivalentes e monovalentes, respectivamente, para que a vacina seja considerada satisfatória e aprovada pelos órgãos regulatórios.

3.1.3.1 Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho, obtidos pelos métodos ELISA e soroneutralização em camundongo

As indústrias farmacêuticas, de modo geral, buscam, a cada dia, incrementar a qualidade dos seus produtos, desenvolvendo técnicas e processos que sejam rápidos e economicamente viáveis, para que tenham o menor impacto possível na margem de contribuição do produto. No entanto, visando como objetivo final à qualidade dos produtos a serem ofertados para o mercado, as indústrias vêm-se obrigadas a escolher processos mais caros

e demorados, em detrimento a outros de custos menos onerosos, mas que não oferecem resultados satisfatórios. Como foi observado neste trabalho, os reagentes que foram submetidos a processos de purificação apresentaram resultados de títulos de anticorpos estatisticamente diferentes de outros não purificados, por meio do método ELISA competitivo modificado. As impurezas existentes nas amostras não purificadas interferem na leitura óptica (A_{492nm}), mascarando os resultados.

Por isso, os coeficientes de correlações mostradas pelas curvas, obtidas a partir de regressões linear simples entre os resultados obtidos no ELISA e na soroneutralização em camundongo foram de 0,05%, para as vacinas polivalentes e 0,03 e 0,05%, para as vacinas monovalentes. Valores muito inferiores ao relatados por Sonobe *et al* (2007), de 74% e por Ebert *et al.* (1999), que encontraram coeficiente de correlação igual a 41% ($p < 0,01$), ao utilizarem vacinas monovalentes de *C. perfringens* tipo D, para imunizar os carneiros. No presente trabalho, verificou-se que não houve diferença significativa entre as correlações observadas nos soros provenientes de animais imunizados com vacinas monovalentes e polivalentes, o que sugere que a baixa correlação não foi decorrente da interferência de outros anticorpos clostridiais, que não aquele produzido especificamente contra a toxina epsilon. Além do mais, os melhores títulos de antitoxina epsilon, obtidos com as vacinas monovalentes, não influenciaram na correlação com os testes de soroneutralização em camundongo. A baixa correlação existente entre os títulos, obtidos por soroneutralização e ELISA pode ser observada, pois os resultados obtidos no ELISA foram muito semelhantes entre os soros com diferentes concentrações de anticorpos, evidenciando a baixa capacidade de detectar diferentes níveis de anticorpos pelo método em estudo (TABELA 3).

Relatos da literatura mostram valores de coeficiente de correlação ainda maiores que os explicitados anteriormente, como, por exemplo, valores de 93% (SOJKA *et al.*, 1989 e WOOD, 1991) e 98% (UZAL *et al.*, 1997), para vacinas polivalentes. A razão da diferença entre os resultados obtidos neste trabalho e relatos da literatura pode ser atribuída ao grau de purificação do antígeno utilizado e à forma de destoxificação da toxina, pois enquanto Sojka

et al. (1989) utilizaram toxóide não purificado e Wood (1991), a protoxina purificada, Uzal *et al.* (1997) utilizaram a toxina ativada após a purificação, o que pode ter aumentado a sensibilidade e a especificidade do teste. Neste trabalho, utilizou-se a toxina epsilon ativada, clarificada e concentrada, mas não purificada em coluna de gel. Essa afirmativa pode ser reforçada, ao verificar que os valores de absorvância obtidos nas leituras dos soros testes são significativamente menores que os resultados obtidos com o anticorpo padrão NIBSC, utilizado para a elaboração da curva padrão. Esse achado justifica a baixa correlação apresentada entre os testes *in vitro* e *in vivo*, o que pode ser evidenciado pelo ponto correspondente ao título do anticorpo padrão NIBSC, que se encontra totalmente fora da curva dos demais títulos dos soros testes. Além do mais, o soro utilizado neste trabalho para padronizar o ELISA não foi o mesmo utilizado para padronizar a toxina utilizada na soroneutralização em camundongo, dificultando a correlação entre os testes avaliados. Há a possibilidade de que esteja predominando ligações de anticorpos não específicos ou ainda a existência de uma baixa afinidade de antitoxina no soro (HENDRIKSEN *et al.*, 1988). Roskopf-Streicher *et al.* (2003) também tiveram dificuldade em avaliar o ELISA competitivo, para quantificar antitoxina epsilon em soro de coelho. Esses autores afirmaram que a falta de linearidade e paralelismo dificultaram a avaliação do método.

Outros autores ainda relatam que a ausência de correlação entre o ELISA e a soroneutralização em camundongo depende do título de anticorpos no soro e afirmam que níveis de anticorpos acima de 0,1 UI/mL se correlacionam fortemente entre os dois métodos, no entanto a correlação decresce, se o nível de anticorpos foi inferior a 0,1 UI/mL. Um título de 0,001 a 0,01 UI/mL, mensurado pela soroneutralização em camundongo pode ser 10 a 100 vezes maior no teste ELISA (HENDRIKSEN *et al.*, 1988; KNIGHT *et al.*, 1986; HAGENAARS *et al.*, 1984). Deve-se considerar que os resultados obtidos pelo teste ELISA estão em função dos reagentes utilizados, da padronização dos mesmos, do tipo de ELISA adotado e até mesmo do modelo estatístico utilizado para estimar os níveis de anticorpos.

3.1.4 Elaboração da Curva Padrão para o teste ELISA competitivo utilizando soro de carneiro

Nas placas sensibilizadas com toxina epsilon padrão, observou-se que, quanto maior a concentração de antitoxina padrão, maior a competição pela toxina absorvida na placa, implicando em menor absorbância a 492 nm, pois o princípio para a elaboração da curva padrão se baseou na inibição da reação entre a imunoglobulina de coelho e a toxina epsilon, absorvida na placa de ELISA, pela adição da antitoxina padrão. Utilizou-se a porcentagem de inibição para o cálculo do título de antissoros de carneiros, pois as leituras de absorbância a 492 nm que dão origem à porcentagem de inibição podem variar e a porcentagem de inibição atenua as diferenças entre os ensaios (UZAL *et al.*, 1997).

A FIGURA 3 mostra que, a partir da porcentagem de inibição, média obtida de 8 repetições, pode-se determinar o título dos soros testados. Quando um soro avaliado apresentou porcentagem de inibição acima de 94,74%, apresentou título superior a 40,8 UI/mL e se apresentou porcentagem de inibição abaixo de 9,67%, o título foi inferior a 0,027 UI/mL. Se a porcentagem de inibição for superior a 100%, dilui-se o soro até que os valores se encaixassem na curva padrão. A curva padrão, obtida a partir de regressões linear simples, mostra 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 96,52%, resultado inferior ao encontrado por Uzal *et al.* (1997), no entanto, similar ao resultado encontrado por Sojka *et al.* (1989), que foi de 98 e 96%, respectivamente. O coeficiente de correlação elevado permite maior segurança e confiabilidade nos resultados da titulação dos soros testados, como relatado anteriormente neste trabalho.

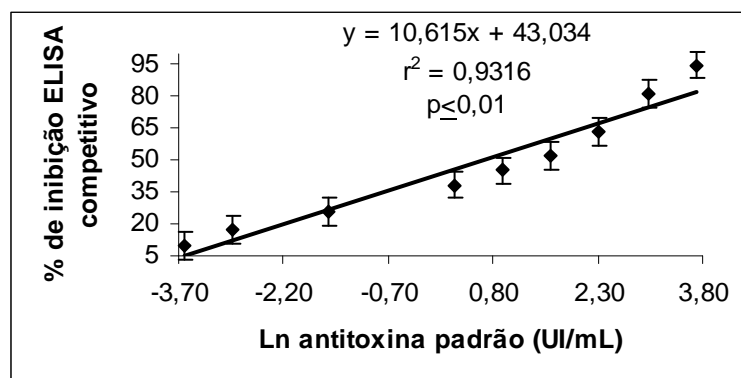


FIGURA 3 – Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidos no ELISA competitivo e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL da antitoxina epsilon padrão

3.1.5 Verificação da aplicação do teste ELISA competitivo, avaliando-se soros de carneiros, imunizados com vacinas anti-clostridiose

Os cálculos das porcentagens de inibição do teste ELISA competitivo modificado para a titulação de soro de carneiro com seus respectivos valores de anticorpos em logaritmo neperiano e os valores de absorbância estão apresentados na TABELA 5.

A análise dos soros foi realizada 12 vezes na mesma placa e em quatro placas diferentes, para a avaliação da variabilidade do teste.

TABELA 5

Porcentagem de inibição do teste ELISA competitivo com respectivos valores de antitoxina epsilon em logaritmo neperiano (Ln UI/mL), valores de absorbância obtidos das placas 1, 2, 3 e 4 e desvio padrão em cada ponto mensurado

Amostra de soro	Média A _{492nm}	% inibição	Ln UI/mL	UI/mL	Ln UI/mL	UI/mL	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	DP (δ)	
<i>in vitro</i> - Placa 1					<i>in vivo</i>				
S1	1,022	44,447	0,133	1,140	0,693	2	0,570	0,038	
S2	1,010	45,112	0,196	1,210	0,693	2	0,605	0,033	
S3	0,818	55,522	1,176	3,240	1,609	5	0,648	0,120	
S4	0,829	54,961	1,124	3,070	1,609	5	0,614	0,110	
S5	0,623	66,140	2,177	8,820	2,303	10	0,882	0,086	
Padrão	1,013	44,940	0,180	1,190	0,693	2	0,595	0,071	
Média	0,886	51,854	0,831	3,112	1,267	4,333	0,652	0,763	
<i>in vitro</i> - Placa 2					<i>in vivo</i>				
S1	1,037	43,678	0,061	1,060	0,693	2	0,530	0,047	
S2	1,018	44,710	0,158	1,170	0,693	2	0,585	0,039	
S3	0,812	55,884	1,211	3,360	1,609	5	0,672	0,103	
S4	0,801	56,468	1,266	3,550	1,609	5	0,710	0,120	
S5	0,623	66,140	2,177	8,820	2,303	10	0,882	0,086	
Padrão	1,019	44,628	0,150	1,160	0,693	2	0,580	0,070	
Média	0,885	51,918	0,837	3,187	1,267	4,333	0,660	0,704	
<i>in vitro</i> - Placa 3					<i>in vivo</i>				
S1	1,019	44,628	0,150	1,160	0,693	2	0,580	0,024	
S2	1,018	44,669	0,154	1,160	0,693	2	0,580	0,039	
S3	0,802	56,427	1,262	3,530	1,609	5	0,706	0,117	
S4	0,800	56,499	1,269	3,560	1,609	5	0,712	0,120	
S5	0,623	66,140	2,177	8,820	2,303	10	0,882	0,086	
Padrão	1,011	45,081	0,193	1,210	0,693	2	0,605	0,028	
Média	0,879	52,241	0,867	3,240	1,267	4,333	0,678	0,689	
<i>in vitro</i> - Placa 4					<i>in vivo</i>				
S1	1,011	45,081	0,193	1,210	0,693	2	0,605	0,033	
S2	1,011	45,081	0,193	1,210	0,693	2	0,605	0,033	
S3	0,802	56,427	1,262	3,530	1,609	5	0,706	0,117	
S4	0,800	56,499	1,269	3,560	1,609	5	0,712	0,120	
S5	0,623	66,140	2,177	8,820	2,303	10	0,882	0,086	
Padrão	1,021	44,547	0,143	1,150	0,693	2	0,575	0,028	
Média	0,878	52,296	0,873	3,247	1,267	4,333	0,681	0,649	

Os resultados de títulos de antitoxina (UI/mL) coincidem com o esperado, uma vez que os valores de absorbância aumentam inversamente proporcional ao aumento dos títulos de antitoxina epsilon e, conseqüentemente, ao aumento da porcentagem de absorbância. Tanto no ELISA como na soroneutralização em camundongos, os títulos dos soros dos carneiros aumentam, na medida em que mais doses de imunógenos são inoculadas nos animais. Esses resultados estão condizentes com os obtidos por Lobato *et al.* (1999), quando avaliaram, por meio do teste de soroneutralização em camundongos, soros de bovinos, imunizados com toxóide botulínico. No entanto, os resultados foram inferiores aos títulos obtidos pela soroneutralização em camundongos, conforme foi relatado anteriormente para o soro de coelho. Em parte, a discrepância de resultados entre títulos, obtidos pelo ELISA, utilizando soro de coelho e carneiro deve-se ao fato de que, para cálculo dos títulos nos soros de carneiros, foi utilizada a porcentagem de inibição, ao passo que, no soro de coelho, o título foi mensurado diretamente, a partir da absorbância. No mais, há características particulares entre um soro e outro que podem ter influenciado nos resultados.

Observa-se que os valores calculados em Ln UI/mL, por meio do método ELISA são inferiores aos resultados obtidos na soroneutralização, no entanto os valores de porcentagens de inibição estão similares aos valores em Ln UI/mL utilizados na curva padrão. A esse fato associa-se o coeficiente de correlação da curva padrão, que foi de 96,52%, o qual, quanto mais próximo de 100%, fornece resultados mais fidedignos à realidade. Situação similar foi observada por Parreiras (2001), ao encontrar coeficiente de correlação igual a 93%.

É importante destacar que os valores de porcentagem de inibição repetem para os soros que apresentam mesmos níveis de antitoxina epsilon, obtidos na soroneutralização *in vivo*.

3.1.5.1 Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de carneiro, obtidos pelos métodos ELISA e soroneutralização em camundongo

Foram realizados testes ELISA e soroneutralização em camundongos comparativos, utilizando-se cinco soros de carneiros, imunizados com imunógenos epsilon de *C. perfringens* tipo D. A FIGURA 4 ilustra as curvas de correlação entre os resultados do ELISA competitivo e soroneutralização em camundongo.

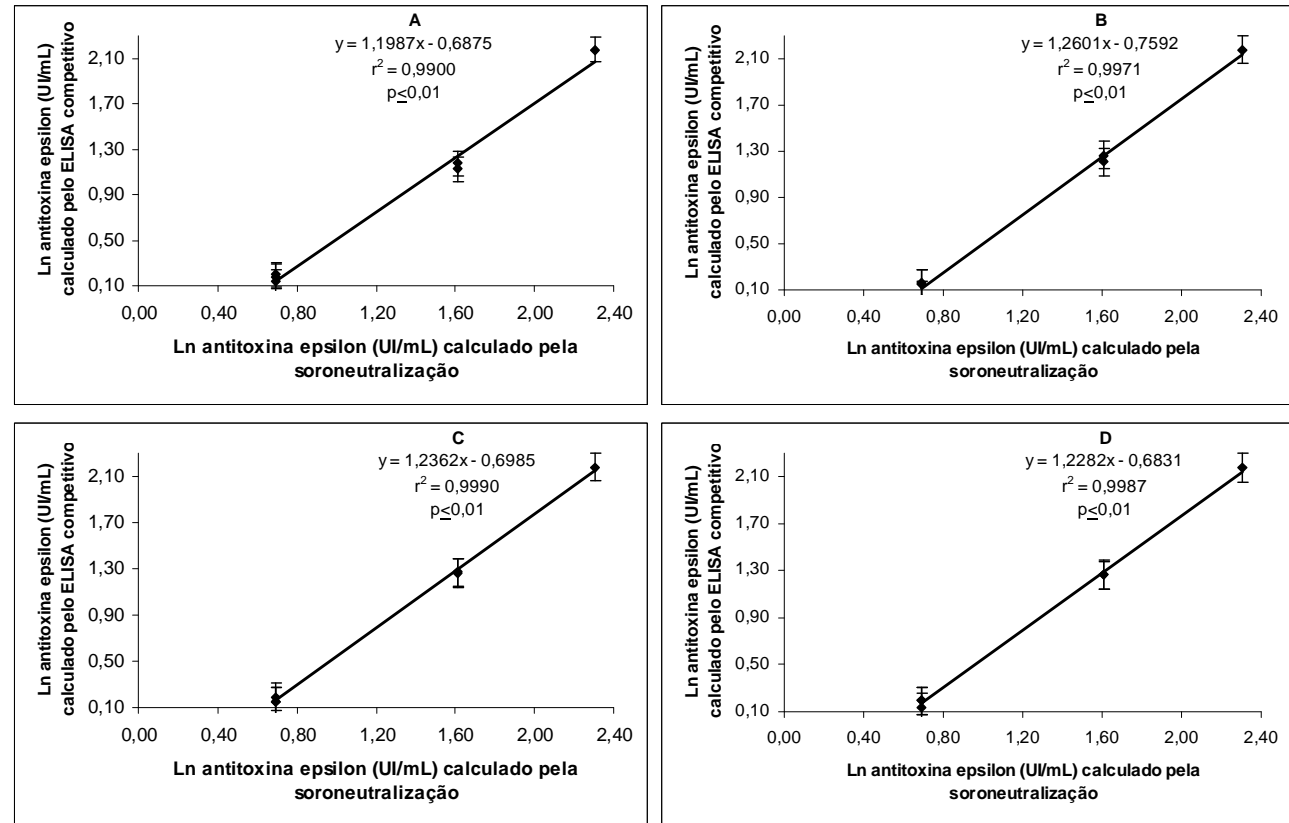


FIGURA 4 – Relação dos títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL) em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos pelos métodos Soroneutralização e ELISA competitivo nas placas 1, 2, 3 e 4 representados em A, B, C e D, respectivamente.

A correlação encontrada entre os resultados obtidos por soroneutralização e ELISA variou de 99,50 a 99,95% entre as placas. Esses resultados foram superiores aos mencionados na literatura, quando se utilizou o ELISA, para a avaliação de potência de outras vacinas bacterianas. No desenvolvimento do teste ELISA, para testar imunogenicidade diftérica, realizado por Manghi *et al.* (1994), utilizando-se soro de cobaio, observaram-se coeficiente de correlação igual a 95% entre os títulos, obtidos pela soroneutralização em camundongos e o ELISA. Manghi *et al.* (1994) utilizaram o ELISA para titular antitoxina tetânica, encontrando coeficiente de correlação com a soroneutralização de 94%. Resultados ainda menores ($r = 0,89$; $p < 0,0005$) foram encontrados por Gupta e Siber (1994), avaliando-se soros coletados após seis semanas da imunização de cobaias contra tétano. Porém esses autores obtiveram títulos maiores no ELISA, quando se utilizou soro de até 4 semanas após a imunização, corroborando resultados obtidos por Habeeb (1975). Parreiras (2001), utilizando soros de carneiros hiperimunes, para verificar a aplicabilidade do ELISA competitivo, a partir de uma curva previamente elaborada, encontrou porcentagens de inibição, variando de 81,90 a 95,05 e coeficiente de correlação entre o método *in vivo* e *in vitro* de 94%, implicando em que a curva padrão previamente elaborada pode ser utilizada para titular soros testados em placas diferentes, viabilizando a aplicação do método.

Os resultados de correlação satisfatórios deste trabalho tendem a garantir a eficiência da curva padronizada, de maneira que, a partir da porcentagem de inibição, pode-se determinar, com maior segurança, os títulos dos soros testados, pois as leituras de absorbância a 492 nm que dão origem à porcentagem de inibição podem variar e a porcentagem de inibição atenua as diferenças entre os resultados (PARREIRAS, 2001). Essa afirmativa corrobora com os resultados deste trabalho, uma vez que o teste ELISA utilizando soro de coelho, cujos cálculos foram baseados em valores de absorbância a 492 nm, e não em porcentagem de inibição, não apresentou boa correlação com o teste *in vitro*.

Na TABELA 6, estão apresentados os coeficientes de variação intra e interplacas.

TABELA 6

Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes

Amostra Soro	CV(%)	
	Intraplaca	Interplaca
S1	1,352	7,293
S2	9,691	2,237
S3	4,656	1,962
S4	4,499	5,846
S5	3,927	1,444
Padrão	2,286	3,953

O coeficiente de variação variou de 1,352 a 9,691% e de 1,444 a 7,293%, para as análises intra e interplaca, respectivamente, não existindo diferença estatística significativa pelo teste F a 1% de probabilidade. Esses resultados se assemelham aos resultados obtidos por Wood (1991), que são de 5,14 e 6,22%, para os coeficientes de variação inter e intraplaca, respectivamente. Em outros trabalhos para avaliação de potência de vacinas contra tétano e difteria, pelo teste ELISA, resultados variados foram relatados. No trabalho realizado por Manghi *et al* (1994), foi encontrado coeficiente de variação intra e interplacas de 3 e 14%, respectivamente, para o teste ELISA, utilizando-se soro de cobaio imunizado contra difteria. Por outro lado, Tijssen (1985) encontrou coeficiente de variação inter e intraplaca de 1,6 e 7,5%, respectivamente, no teste ELISA, utilizando-se soro de cobaio, imunizado contra tétano. Os resultados variados encontrados na literatura, bem como neste trabalho, sugerem que fatores externos, tais como: pipetadores, pipetagens, placas, operadores e dias diferentes, podem interferir nos resultados de titulação de antitoxina pelo teste ELISA. No entanto, a pequena variação do desvio padrão neste trabalho se apresentou satisfatória, pois implica em que o teste foi uniforme, com pouca discrepância entre os resultados.

No trabalho realizado por Parreiras (2001), utilizando a mesma técnica do presente trabalho, relatou-se que a variação dos resultados aumenta, à medida que as concentrações da antitoxina diminuem, pois o aumento da diluição aumenta a probabilidade de erro. Entretanto, no presente trabalho, essa relação não foi observada, uma vez que os menores títulos de antitoxina não foram decorrentes de maiores diluições, mas sim da concentração original do soro de carneiro.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, obtiveram-se as seguintes conclusões:

- a porcentagem de inibição para calcular o título de antitoxina epsilon reduz a discrepância de resultados, permitindo melhor correlação entre o teste ELISA e soroneutralização em camundongo;
- há reprodutibilidade do teste ELISA, uma vez que apresentou baixos coeficientes de correlação inter e intraplaca;
- há alta correlação entre os testes ELISA e soroneutralização em camundongo, para mensurar níveis de anticorpos, dependendo do tipo de soro e da metodologia utilizados;
- a purificação e a padronização de reagentes é fundamental, para boa correlação entre os métodos soroneutralização em camundongo e ELISA;
- é necessária a validação da técnica *in vitro*, apresentada neste trabalho, para que possa substituir a metodologia *in vivo* soroneutralização em camundongo.

5 REFERÊNCIAS

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, mar. 1998.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 7. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1955.

BLACKWELL, T. E.; BUTLER, D. G.; PRESCOTT, J. F.; WILCOCK, B.P. Clinical signs, treatment, and postmortem lesions in dairy goats with enterotoxemia: 13 cases (1979 – 1982). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 2, p. 214-217, Feb. 1992.

BRANDI I. V. **Avaliação das condições de crescimento de Clostridium perfringens tipo B e da produção de toxinas utilizadas na produção de vacinas veterinárias**. 2000. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

EBERT, E.; ÖPPLING, V.; WERNER, E.; CUSSLER, K. Development and revalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* Beta and Epsilon toxoid containing veterinary vaccines. **FEMS Immunology and microbiology**, v. 24, p. 299-311, 1999.

EL IDRISSE, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 389-396, June. 1992b.

GUPTA, R. K.; SIBER. G. R. Comparative analysis of tetanus antitoxin titers of sera from immunized mice and guinea pigs determined by toxin neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Biologicals**, v. 22, p. 215-219, Sep. 1994.

HABEEB, A. F. S. A. Studies on epsilon protoxin of *Clostridium perfringens* type D physicochemical and chemical properties of protoxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 412, p. 62-69, Jul. 1975.

HAGENAARS, A.; VAN DELFT, R.; NAGEL, J. Comparison of ELISA and toxin neutralization test for determination of tetanus antibodies. **Journal of Immunoassay**, v. 5, p. 1-11, May. 1984.

HENDRIKSEN, C. F. M.; V. D. GUN, J. W.; NAGEL, J.; KREEFTENBERG, J. G. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. **Journal of Biological Standardization**, v. 16, p. 287-297, Oct. 1988.

KNIGHT, P. A.; BURNETT, C.; WHITAKER, A. M.; QUEMINET, J. The titration of clostridial toxoids and antisera in cell culture. **Developments in Biological Standardization**, v. 64, n. 15, p. 129-136, Sep. 1986.

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**, v. 3, n. 4, p. 201-217, Nov. 1993.

LOBATO, F. C. F.; ALMEIDA, A. C.; ABREU, V. L. V. *et al.* Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipo C e D. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 25-27, abr. 1999.

LOBATO, F. C. F., ASSIS, R. A. Controle e profilaxia das clostridioses. **A Hora Veterinária**, v. 19, n. 113, 2000.

MANGHI, M. A.; PASETTI, M. F.; BRERO, M. L.; DELUCHI, S.; DI PAOLA, G.; MATHET, V.; ERIKSSON, P. V. Development of an ELISA for measuring the activity of tetanus toxoid in vaccines and comparison with the toxin neutralization test in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 168, p. 17-24, Jan. 1994.

PARREIRAS, P. M. **Padronização do teste de ELISA competitivo para detecção de anticorpos contra protoxina epsilon produzida pelo Clostridium perfringens**. 2001. 28 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ROSSKOPF-STREICHER, U.; VOLKERS, P.; WERNER, E. Control of Clostridium perfringens Vaccines using an Indirect Competitive ELISA for the Epsilon Toxin Component. **Pharmeuropa Bio**, v. 3, n. 2, p. 91-96, Jan. 2003.

SOJKA, M. G.; WHITE, V. J.; THORNS, C. J.; *et al.* The detection of Clostridium perfringens epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody bas ELISA. **Journal of Biological Standardization**, v. 17, p. 117-124, Sep. 1989.

SONOBE, M. H.; TREZENA, A. G.; GUILHEN, F. B.; TAKANO, V. L.; FRATELLI, F.; SAKAUCHI, D.; MORAIS, J. F.; PRADO, S. M. A.; HIGASHI, H. G. Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.69-76, Oct. 2007.

TIJSSEN, P. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: BURDON, R. H.; VAN KNIPPENBERG, P. H. (Eds). **Practice and theory of enzyme immunoassays**. Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 15, p. 385.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2002. 329 p.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. In: **CODE of Federal Regulations**. Washington: United States Department of Agriculture, 2006. Part 113, p. 618-748.

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, Sep. 1997.

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, Oct. 1991.

CAPÍTULO 3 - QUANTIFICAÇÃO DE ANTITOXINA EPSILON EM SORO DE ANIMAIS, IMUNIZADOS, UTILIZANDO ToBI (*Toxin binding inhibition*) TEST MODIFICADO

RESUMO

Atualmente, o teste de eficiência de vacinas contra clostridioses é realizado *in vivo*, utilizando-se, normalmente, camundongos. Por razões éticas, grupos humanitários não têm medido esforços para substituir e reduzir o número de animais utilizados em experimentos de pesquisa, mobilizando cientistas, industriários e órgãos regulatórios. A substituição de testes envolvendo animais de laboratório por testes *in vitro* é de grande interesse para a classe científica, devido à dificuldade de se obter qualidade adequada dos animais de laboratório, adequadas condições ambientais para os diversos tipos de experimentos e, sobretudo, variabilidade dos resultados, obtidos dos testes que envolvem animais. Essas barreiras tornam, muitas vezes, os trabalhos onerosos e impraticáveis. Desse modo, este trabalho foi desenvolvido, com o objetivo de avaliar e padronizar o ToBI test *in vitro*, para ser utilizado no controle de qualidade de vacinas contra clostridioses, em substituição ao teste de soroneutralização em camundongo. Para a realização deste trabalho, foram utilizados soros, com concentração de anticorpos conhecida, de 40 coelhos e 3 carneiros, imunizados com vacinas experimentais contra clostridioses, os quais foram avaliados por meio do método proposto *in vitro*. Primeiramente, foi elaborada uma curva padrão, a partir da qual, foi possível mensurar a quantidade de anticorpos presentes nos soros testes. Ao término do trabalho os principais resultados obtidos apontaram boa correlação, variando de 94,23 a 97,75%, entre o ToBI test e a soroneutralização em camundongos para a titulação de antitoxina epsilon presente em soro de coelhos, imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes contra *Clostridium perfringens* tipo D. O coeficiente de variação intraplaca variou de 0,222 a 0,452%, para as vacinas polivalentes e de 0,154 a 0,387%, para as vacinas monovalentes. Os valores dos coeficientes de variação interplaca foram ainda menos expressivos, atingindo um máximo de 0,350% e 0,400%, para as vacinas polivalentes e monovalentes, respectivamente, indicando alta homogeneidade nos resultados. Utilizando-se soro de carneiro, obteve-se coeficiente de correlação maior que 97%, corroborando dados da literatura. O coeficiente de variação inter e intraplaca se mostraram relativamente baixo, não atingindo 1,3%. Conclui-se que a metodologia *in vitro*, ToBI test, é apropriada e indicada para a avaliação de potência de vacinas clostridiais, uma vez que apresentou boa correlação com a tradicional metodologia *in vivo*, utilizada atualmente. No entanto, é necessária a validação do ToBI test, para que possa substituir definitivamente a metodologia *in vivo* soroneutralização em camundongo.

Palavras chave: Clostridioses. Metodologias *in vitro*. Ética animal. Teste de potência.

CHAPTER 3 - EPSILON ANTITOXIN QUANTIFICATION IN IMMUNIZED ANIMAL SERUM BY USING MODIFIED TOXIN-BINDING INHIBITION (TOBI) TEST.

ABSTRACT

Nowadays, tests of vaccine efficacy against clostridiosis are usually performed *in vivo* by using mice. Due to ethics matter, humanitarian groups have been persistent in trying to replace or reduce the number of animals used in scientific trials; scientists, industrialists and regulator agencies have been involved in such discussions. Replacing tests that involve laboratory animals by those ones *in vitro* is a matter of great interest for scientists due to difficulties in finding the adequate quality of the animals, the adequate environmental conditions to the several kinds of trials and, especially, due to the variability of the results that tests show when animals are involved. Such obstacles sometimes make researches harder and impracticable. Therefore, this study was carried out in order to assess and standardize *in vitro* ToBI test so as to have it used for the quality control of vaccine against clostridiosis, replacing the serum neutralization in mice. This study used sera, at a known antibody concentration, of 40 rabbits and 3 sheep that were immunized with experimental vaccines against clostridiosis. They were evaluated through the proposed *in vitro* method. Firstly a pattern curve was figured out, and through that it was possible to measure the amount of antibodies present in the sera tests. At the end of the study, the main results pointed a good correlation, ranging from 94.23 to 97.75% between ToBI test and serum neutralization in mice for the titration of epsilon antitoxin present in the serum of rabbits immunized with polyvalent and monovalent vaccines against *Clostridium perfringens* type D. The intraplate variation ratio ranged from 0.222 to 0.452% for polyvalent vaccines, and from 0.154 to 0.387% for monovalent vaccines. The degrees of the interplate variation ratios were even less expressive – a maximum of 0.350% and 0.400% for polyvalent and monovalent vaccines, respectively – what shows a high homogeneity of the results. When sheep serum was used, the correlation ratio was higher than 97%, corroborating literature review. Inter and intraplate variation ratios were relatively low, less than 1.3%. Therefore, it is concluded that the *in vitro* method, ToBI test, is appropriate and indicated to assess the potency of clostridial vaccine, for it presented a good correlation with the traditional *in vitro* methods that have been used currently. However, a TOBI test validation is needed so as to definitely replace *in vivo* serum neutralization in mice.

Key words: Clostridiosis. *In vitro* methods. Animal ethics. Potency test.

1 INTRODUÇÃO

A enterotoxemia é a principal doença causada por *Clostridium perfringens* tipo D em ovinos, em caprinos e em bovinos, quando submetidos a fatores que alteram a microbiota intestinal, como mudança brusca na alimentação e estresse pós desmame, com morte súbita, após o início dos sintomas (EL IDRISSEI; WARD, 1992). A evolução da doença em animais jovens é quase sempre de caráter agudo ou superagudo, dificultando o tratamento. O processo pode ser prevenido, por meio da imunização com vacinas.

O diagnóstico presuntivo de enterotoxemia pode fundamentar-se em dados de anamnese e de exame físico. A sua confirmação, entretanto, requer o emprego de métodos específicos, visando à neutralização da toxina, em materiais provenientes de indivíduos afetados, por soroneutralização, na qual a inoculação prévia da antitoxina específica protege o camundongo dos efeitos da intoxicação iatrogênica. O mesmo princípio de reação entre toxina e antitoxina é adotado para mensurar níveis de anticorpos em soros de animais imunizados, a fim de avaliar a eficiência de vacinas clostridiais, atestando a qualidade das mesmas, seja por órgãos oficiais de controle ou pelas próprias empresas produtoras de vacinas.

O teste de neutralização *in vivo*, considerado como padrão para a dosagem de anticorpos anti-epsilon, possui alta sensibilidade, porém é um método caro, requer tempo, grande quantidade de animais e técnicos especializados. Dessa forma, têm sido propostos os testes *in vitro* para o controle de qualidade de vacinas contra clostridioses que, além de apresentarem correlação satisfatória com os testes *in vivo*, proporcionam a redução de animais utilizados em testes de pesquisa.

O ToBI test, que apresenta uma boa correlação com a soroneutralização em camundongos em todas as concentrações de anticorpos, se baseia na inibição da ligação entre toxina e antitoxina, que se encontra adsorvida a uma microplaca, por anticorpos, pré-incubados, provenientes de animais imunizados (BONETTI, 2002). Primeiramente, o ToBI test foi desenvolvido, para determinar o título de antitoxina contra a

toxina tetânica e diftérica em soro humano (HENDRIKSEN *et al.*, 1988). Posteriormente, Hendriksen *et al.* (1989) utilizaram o ToBI test, para estimar a potência do toxóide diftérico, baseado na indução de antitoxina em camundongo. Mais tarde, Hendriksen *et al.* (1991) realizaram um estudo, no qual utilizaram o ToBI test para estimar a potência do toxóide tetânico, presente em vacinas. O ToBI test pode ser uma alternativa para o desafio letal em camundongos, devido à capacidade em estimar níveis de antitoxina neutralizantes em amostras de soro de animais imunizados. Estudos confirmam o fato de que há uma boa correlação entre o ToBI test e a soroneutralização em camundongo.

Em decorrência do grande impacto econômico provocado pela presença constante da enterotoxemia em caprinos, em ovinos e em bovinos em todo o mundo, a prevenção se torna o grande desafio dos produtores de caprinos e de ovinos, bem como dos industriários que desenvolvem vacinas clostridiais. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e padronizar o ToBI test, para que possa ser utilizado no controle de qualidade de vacinas contra clostridioses, em comparação ao teste de soro neutralização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes utilizados na realização do ToBI test modificado para o controle de qualidade de vacinas clostridiais

Foram utilizados soros de coelhos e carneiros imunizados, com concentração de anticorpos anti-epsilon conhecida (TABELA 1).

Foi utilizado o 2º padrão internacional para a antitoxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (2CpEpsilonAt), preparado e caracterizado pelo Veterinary Laboratories Agency (Weybridge, Surrey, Reino Unido), cuja custódia e distribuição estão a cargo do National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC (Potters Bar, Reino Unido). A toxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D; produzida em meio sugerido por Brandi (2000), a 37°C, 200 rpm, por 15 horas; foi padronizada ao nível de teste L+/10 (UNITED STATES, 2006). As toxinas foram clarificadas por sistema de filtração tangencial e, em seguida, concentradas por ultrafiltração, sendo posteriormente submetidas ao processo de inativação, utilizando-se formol a 37%. Após esse processo de destoxificação, as suspensões foram denominadas de toxóides.

As placas de poliestireno e as placas de imunoensaio, bem como solução de lavagem (solução de NaCl 0,9% p/v contendo 0,05% de Tween-20), conjugado de anti-soro de coelho da marca SIGMA®, substrato enzimático ortofenilenodiamino (0,4mg/mL) com peróxido de hidrogênio 30 volumes (0,2 µL/mL) preparado em solução tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e solução 2M H₂SO₄ foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A.

2.2 Titulação de antitoxina epsilon em soro teste de coelhos e carneiros, imunizados contra *Clostridium perfringens* tipo D, pelo método *in vitro* – ToBI test modificado

Primeiramente, realizou-se a padronização dos reagentes a serem utilizados no ToBI test, a fim de estabelecer concentrações adequadas para a

realização do teste. O procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho e de conjugado anti-soro de coelho utilizados no ToBI test se encontra descrito no item 2.2.1.

2.2.1. Procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho e de conjugado anti-soro de coelho utilizados no ToBI test modificado

Foram avaliadas diluições de antígenos e anticorpos, a fim de selecionar as diluições que permitissem absorbância próximo de 1, numa faixa de 0 a 2, obtida num comprimento de onda de 492 nm. O antígeno (toxina padrão contendo 2560 L+/10/mL na titulação *in vivo*) foi preparado puro e nas diluições 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 e 1:2560 e o anticorpo (soro de coelho imunizado com vacina anti-epsilon contendo 5 UI/mL na soroneutralização *in vivo*) puro e nas diluições, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. A antitoxina padrão NIBSC (8 UI/mL) foi utilizada pura e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. O conjugado anti-soro de coelho de marca SIGMA[®] foi utilizado na diluição 1:20.000, conforme recomendação do fabricante.

A placa foi sensibilizada com 100 µL da antitoxina padrão NIBSC diluída em tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato (0,05M e pH 9,6). Após 12 horas de incubação a 4 °C e lavagem, a placa foi bloqueada com 200 µL de solução de albumina 3% e incubada a 37 °C por 60 min. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de toxina padrão, em cada orifício da placa e, em cada linha da placa, foi colocada uma diluição da toxina, incubando a 37 °C, por 60 min. Após lavagem, foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-epsilon de soro de coelho, e cada diluição em duas colunas da placa, incubando a 37 °C, por 60 min. Foram adicionados 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho, diluído com tampão de diluição e novamente incubaram-se as placas a 37 °C, por 60 min e lavaram-se 6 vezes com 100 µL de solução de lavagem. Por fim, foram adicionados 100 µL do substrato enzimático (OPD). O substrato foi preparado dissolvendo 10 mg de OPD (orto-fenilenodiamino) em 25 mL de tampão citrato (0,15M e pH 5), acrescido de 12,5 µL de peróxido de hidrogênio (1:1150 partindo da amostra

pura) e incubou-se a 37 °C, por 60 min, adicionando, em seguida, 20 µL de ácido sulfúrico (1:20 partindo da amostra pura). Esse substrato foi preparado no momento do uso.

Os reagentes padronizados foram utilizados na realização do ToBI test, utilizando soro de coelho e carneiros imunizados.

O controle do conjugado foi realizado na última linha da placa, desenvolvendo todas as etapas descritas anteriormente, exceto a adição de anticorpo de coelho (UZAL *et al.*, 1997).

2.2.2 Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para a análise de soro de coelho imunizado

Primeiramente, sensibilizaram-se as placas com antitoxina epsilon padrão (NIBSC) e, em seguida, acrescentaram-se 100 µL de toxina epsilon padrão. As concentrações de toxina e de antitoxina foram previamente estabelecidas. Utilizou-se soro de coelho nas concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 UI/mL, para obter a correlação com a absorbância e, assim, elaborar a curva padrão.

Os ensaios foram realizados com 8 repetições, em uma mesma placa.

2.2.3 ToBI test modificado, utilizando soro de coelho imunizado

A metodologia utilizada neste trabalho para a realização do ToBI test foi a descrita por Fayez *et al.* (2005), com as seguintes modificações: a placa de diluição foi bloqueada, adicionando-se 250 µL solução de albumina 3% e incubando a 37 °C por 60 min. Após a lavagem, foi realizada a diluição seriada do soro teste na placa de diluição, utilizando o fator dois, para um volume final de 100 µL, e acrescentaram-se 100 µL de toxina padrão, na diluição estabelecida no item 2.2.1., em cada um dos orifícios. A placa foi agitada e incubada a 37°C, em atmosfera úmida, por 60 min.

Na etapa de sensibilização, foram colocados 100 µL antitoxina padrão NIBSC contendo 1 UI/mL, diluída com tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato (0,05M e pH 9,6). Após período de incubação de 12 horas a 4 °C

e lavagem, a placa foi bloqueada, com 200 μ L de solução de albumina 3% e incubada a 37 °C por 60 min. Foram adicionados, na placa, 100 μ L da mistura soro teste e toxina, diluída em tampão de diluição e incubou-se a 37°C por 60 min. Após esse tempo de reação, foram adicionados 100 μ L de anticorpo anti-epsilon de soro de coelho (5 UI/mL) na diluição padronizada previamente e, novamente, a placa foi incubada a 37 °C, por 60 min. Foram adicionados 100 μ L de conjugado de anti-soro de coelho, diluído com tampão de diluição e submetido à incubação a 37 °C, por 60 min. Finalmente, foram adicionados 100 μ L do substrato enzimático (OPD), preparado, conforme descrito no item 2.2.1.

Para maior confiabilidade nos resultados obtidos, foi realizado também o mesmo procedimento com um soro de potência conhecida, denominado de antitoxina padrão (NIBSC).

A quantificação da antitoxina epsilon, presente em soros de coelhos em UI/mL, foi realizada, por meio de uma curva de regressão linear, obtida com diferentes concentrações do soro padrão em UI/mL, versus a leitura da densidade óptica em cada concentração do padrão utilizado, pelo método de interpolação.

O procedimento com cada um dos soros teste foi realizado 12 vezes, na mesma placa e em 2 placas distintas, porém de mesmo lote.

2.2.4 Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para a análise de soro de carneiro imunizado

A antitoxina epsilon padrão NIBSC foi diluída para conter 5,1; 2,55; 1,275; 0,213; 0,053 e 0,027 UI/mL. Para cada uma das diluições, colocaram-se 50 μ L junto com o mesmo volume de soro de coelho, utilizando-se 50% da diluição previamente padronizada, para ambas competirem pela toxina epsilon, adicionada à placa de diluição. Cada diluição foi colocada em uma linha da placa. Antes de adicionar a mistura antitoxina epsilon padrão NIBSC e soro, adicionaram-se, na placa de diluição, 100 μ L de toxina na diluição estabelecida previamente, sendo, em seguida, incubada por 1 hora.

Em cada placa utilizada, foram realizados dois controles, a saber:

Controle 0% de inibição: na penúltima linha da placa, apenas colocou-se o soro de coelho, sem a antitoxina padrão.

Controle 100% de inibição: na última linha, apenas colocaram-se as diluições da antitoxina padrão, sem a adição de soro de coelho, sendo este o ponto de menor diluição da antitoxina epsilon padrão.

O quanto a antitoxina epsilon padrão NIBSC inibia a ligação do anticorpo, do soro de coelho, à toxina epsilon padrão, que foi colocada na placa, foi expresso em porcentagem de inibição e, a partir desses valores, elaborou-se a curva padrão, correlacionando essa porcentagem de inibição com a potência em unidades internacionais (UI/mL) do soro padrão (UZAL *et al.*, 1997). O ensaio foi realizado em 8 vezes, em uma mesma placa.

Na interpretação dos resultados, foram sempre considerados os controles zero e 100% de inibição da ligação do anticorpo do soro de coelho com a toxina epsilon, adicionada à placa de diluição.

A porcentagem de inibição, utilizando-se números relativos (UZAL *et al.*, 1997), foi calculada, conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{t \times 100}{z}$$

Sendo:

x = 0% de inibição

y = 100% de inibição

t = x – absorvância do soro teste

z = x – y

2.2.5 ToBI test modificado utilizando soro de carneiro imunizado

Para a realização do ToBI test modificado, a fim de quantificar o anticorpo, presente em soro de carneiros imunizados, seguiu-se o mesmo procedimento adotado para a elaboração da curva padrão, apenas substituindo a antitoxina epsilon padrão pelo soro teste de carneiro imunizado (UZAL *et al.*, 1997). Foram testados 5 diferentes soros de carneiros.

O procedimento para cada soro teste foi realizado com 12 replicatas e em 4 placas distintas de mesmo lote, para a avaliação da variabilidade do teste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Titulação de antitoxina epsilon em soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra *Clostridium perfringens* tipo D, pelo método *in vitro* – ToBI test modificado

A reação do ToBI test é baseada na capacidade da antitoxina adsorvida à placa em ligar-se à toxina que foi interagida com anticorpos presentes nos soros testes (SONOBE *et al.*, 2007). Antes da realização do ToBI test propriamente dito, foram realizados procedimentos para a padronização dos reagentes utilizados na execução da prova, cujos resultados estão apresentados no item a seguir.

3.1.1 Procedimento de padronização de antígeno, de anticorpo de coelho e de conjugado anti-soro de coelho utilizados no ToBI test modificado

A antitoxina epsilon padrão com 8 UI/mL, diluída 1:4 mostrou ser suficiente para sensibilizar as placas e a imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de coelho, conjugada à peroxidase foi utilizada na diluição 1:20.000, conforme recomendação do fabricante.

A imunoglobulina de coelho com 5 UI/mL foi ensaiada pura e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. A toxina contendo 2560 L+/10/mL foi testada nas diluições de 1:1 a 1:16384. As diluições escolhidas para serem utilizadas no ToBI test modificado foram aquelas que forneceram absorvância próxima de 1, numa leitura espectrofométrica a 492 nm. Essa diluição foi a 1:4, para a imunoglobulina de coelho e para a toxina padrão.

3.1.2 Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para a análise de soro de coelho

Após ensaiar nove concentrações de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho obteve-se a curva padrão, que foi utilizada para estimar os

níveis de antitoxina epsilon, presente nos soros testados. Na FIGURA 1, estão apresentados os valores da titulação de antitoxina epsilon, em várias concentrações (Ln UI/mL), com respectivos valores de absorbância, média obtida do teste, repetido em 8 vezes na mesma placa.

Os resultados apresentados estão condizentes com o esperado, uma vez que os valores de absorbância aumentam, na medida em que os títulos de antitoxina epsilon, em UI/mL, diminuem (MATOS *et al.*, 2002).

Formulou-se a curva padrão, que mostra a correlação entre os valores da absorbância no ToBI test modificado e o Ln dos valores em UI/mL de soro de coelho (FIGURA 1).

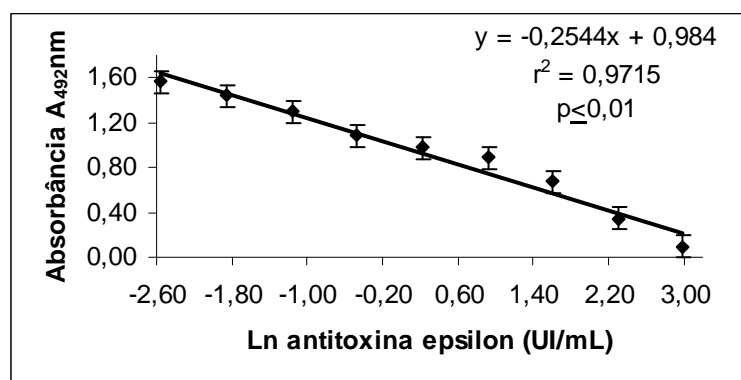


FIGURA 1 - Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorbância ($A_{492\text{nm}}$) no ToBI test modificado e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores em UI/mL de antitoxina epsilon em soro de coelho.

A FIGURA 1 representa a curva padrão, estabelecida com concentrações de antitoxina de 0,078 a 20 UI/mL, sendo cada concentração de antitoxina misturada com toxina padrão com 640 L+/10/mL, que corresponde à toxina padronizada contendo 2560 L+/10 diluída 1:4. Observa-se que a menor concentração de antitoxina capaz de neutralizar a toxina foi 0,78 UI/mL.

A correlação encontrada de 98,56% sugere confiabilidade aos resultados obtidos posteriormente na análise dos soros testados, pois, quanto maior o coeficiente de correlação obtido na curva padrão, mais confiáveis e

seguros os resultados provenientes dos cálculos da curva, conforme admite Parreiras (2001). No entanto, 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.

3.1.3 Verificação da aplicação do ToBI test modificado, avaliando-se soros de coelhos imunizados com vacinas anti-clostridiose

Na TABELA 1, estão apresentados os resultados das titulações, obtidas pelo ToBI test modificado, de antitoxina epsilon (UI/mL), em Ln, presentes em soros de coelhos imunizados.

TABELA 1

Titulos de antitoxina epsilon (UI/mL) em logaritmo neperiano, presentes em soros de coelho imunizados com vacinas polivalentes, pelo método de ToBI test modificado, nas placas 1 e 2 e o desvio padrão em cada ponto mensurado

Vacina experimental	A _{492nm}	Ln UI/mL	UI/mL	Ln UI/mL	UI/mL	<i>In vivo in vitro</i>	DP (δ)
<i>In vitro - Placa 1</i>				<i>In vivo</i>			
1	0,806	0,702	2,018	1,386	4	1,982	0,064
2	1,114	-0,513	0,600	0,000	1	1,666	0,072
3	0,796	0,740	2,096	1,386	4	1,908	0,045
4	0,885	0,390	1,477	0,693	2	1,354	0,044
5	0,819	0,650	1,915	1,099	3	1,566	0,042
Média	0,884	0,394	1,621	0,913	2,800	1,695	0,053
6	0,788	0,769	2,158	1,609	5	2,317	0,067
7	0,629	1,397	4,043	2,302	10	2,473	0,043
8	0,641	1,350	3,857	2,302	10	2,593	0,049
9	1,030	-0,179	0,836	0,000	1	1,196	0,026
10	0,805	0,704	2,021	1,099	3	1,484	0,032
Média	0,779	0,808	2,583	1,462	5,800	2,013	0,043
<i>In vitro - Placa 2</i>				<i>In vivo</i>			
1	0,799	0,727	2,069	1,386	4	1,933	0,063
2	1,055	-0,279	0,756	0,000	1	1,322	0,142
3	0,795	0,742	2,100	1,386	4	1,905	0,045
4	0,887	0,380	1,462	0,693	2	1,368	0,044
5	0,805	0,705	2,024	1,099	3	1,482	0,053
Média	0,868	0,455	1,682	0,913	2,800	1,602	0,069
6	0,794	0,746	2,108	1,609	5	2,372	0,110
7	0,610	1,469	4,345	2,302	10	2,301	0,062
8	0,622	1,422	4,145	2,302	10	2,412	0,168
9	1,033	-0,194	0,824	0,000	1	1,213	0,222
10	0,806	0,701	2,016	1,099	3	1,488	0,074
Média	0,773	0,829	2,688	1,462	5,800	1,957	0,127

Verificou-se a coerência nos resultados apresentados, uma vez que os maiores valores de absorbância são obtidos com os menores títulos de antitoxina epsilon, sugerindo menor resposta imunológica pelos animais. Hendriksen (1991) também observou que os maiores valores de absorbância são provenientes de soros que apresentam maiores concentrações de anticorpos.

Os resultados obtidos pelo ToBI test modificado foram inferiores aos resultados obtidos na soroneutralização para todas as vacinas, conforme pode ser observado pelos resultados da relação *in vivo* / *in vitro* que atingiu um mínimo de 1,196. Esse fato pode ser justificado pela utilização de soro padronizado não purificado, para ligar-se à toxina aderida na antitoxina padrão adsorvida na placa. Além disso, o soro utilizado para a referida ligação não teve participação na padronização do teste *in vivo*. Nos trabalhos realizados por Favez *et al.* (2005) e Sonobe *et al.* (2007), os títulos de anticorpos, obtidos pelo ToBI test e soroneutralização foram similares. No entanto, esses autores relatam a utilização de antitoxina padrão purificada. Hendriksen *et al.* (1988) explicam que diferentes padrões de antitoxina utilizadas nas reações de ligação envolvidas no ToBI test influenciam nos resultados obtidos, pois encontraram resultados, variando de maior que 0,1 UI/mL a menor que 0,05 UI/mL, quando utilizaram gangliosideo GT1b e antitoxina tetânica de cavalo purificada. Esses autores afirmam que as ligações formadas entre toxina e anticorpo, quando se utilizam antitoxinas com diferentes níveis de purificações, podem ser predominantemente ligações não específicas, alterando, substancialmente, os resultados.

A similaridade entre os resultados obtidos pelo ToBI test e a soroneutralização também foi observado por Matos *et al.* (2002), quando utilizaram reagentes purificados.

A variação existente entre os resultados provenientes de uma mesma placa e de placas diferentes foi estudada. Na TABELA 2, estão contemplados os coeficientes de variação apresentados pelos testes realizados inter e intraplaca.

TABELA 2

Coeficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de coelhos imunizados, com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes

Vacina Experimental	CV(%)	
	Intraplaca	Interplaca
1	0,342	0,101
2	0,452	0,142
3	0,242	0,110
4	0,222	0,160
5	0,239	0,350
6	0,387	0,400
7	0,246	0,080
8	0,385	0,128
9	0,361	0,288
10	0,154	0,310

1 a 5 Vacinas polivalentes
6 a 10 Vacinas monovalentes

O coeficiente de variação intraplaca variou de 0,222 a 0,452%, para as vacinas monovalentes e de 0,154 a 0,387%, para as vacinas polivalentes, não apresentando diferença estatística significativa pelo teste F a 1% de probabilidade. Os valores dos coeficientes de variação interplaca foram ainda menos expressivos, atingindo um máximo de 0,350% e 0,400%, para as vacinas polivalentes e monovalentes, respectivamente. Esses resultados indicam que a metodologia *in vitro* ToBI test apresenta alto grau repetibilidade, devido à baixa variação entre os resultados obtidos na mesma placa e em placas diferentes, estabelecendo confiabilidade aos resultados. Assim, os resultados obtidos pelo ToBI test apresentam alta homogeneidade, não sendo detectada diferença significativa entre os resultados.

Apesar de usado com eficiência neste trabalho, o ToBI test envolve uma série de procedimentos minuciosos que devem ser totalmente

respeitados, para que se tenham bons resultados. A atenção se inicia na preparação dos reagentes e de materiais biológicos, e intensifica-se nos cuidados que devem ser tomados na manipulação dos substratos e, principalmente, do conjugado, pois se trata de proteínas que podem ser degradadas facilmente por incidência de luz e alteração de temperatura de conservação. Além do antígeno e do anti-soro, a prova necessita de outros reagentes perecíveis que exigem ótima conservação.

Por isso, a interpretação confiável desse novo teste dependeu dos resultados de alguns controles, como, por exemplo, o antígeno e o anticorpo, que foram individualmente testados para verificar a especificidade dos mesmos. Para conferir uma maior margem de segurança, a especificidade foi testada com antígeno e anticorpo, em concentrações maiores e menores que as usadas no teste, ficando a antitoxina reduzida a uma quantidade suficiente, para neutralizar a toxina.

A evidenciação de anticorpos pelo ToBI test modificado foi precisa e valiosa para estudos imunoenzimáticos, sendo indicada como uma técnica imunoenzimática importante à disposição da investigação de níveis de anticorpos nos soros de animais imunizados e que pôde auxiliar na avaliação da resposta imune sérica, para verificar a eficiência das vacinas testadas.

3.1.3.1 Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho, obtidos pelos métodos ToBI test modificado e soroneutralização em camundongo

Na comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de coelho, obtidos pelos métodos de ToBI test modificado e soroneutralização em camundongo, foram encontrados coeficientes de correlação satisfatório entre os dois testes. A FIGURA 2 representa as curvas que mostram a correlações existentes entre os resultados dos títulos de anticorpos dos soros de coelho, obtidos por soroneutralização em camundongo e ToBI test.

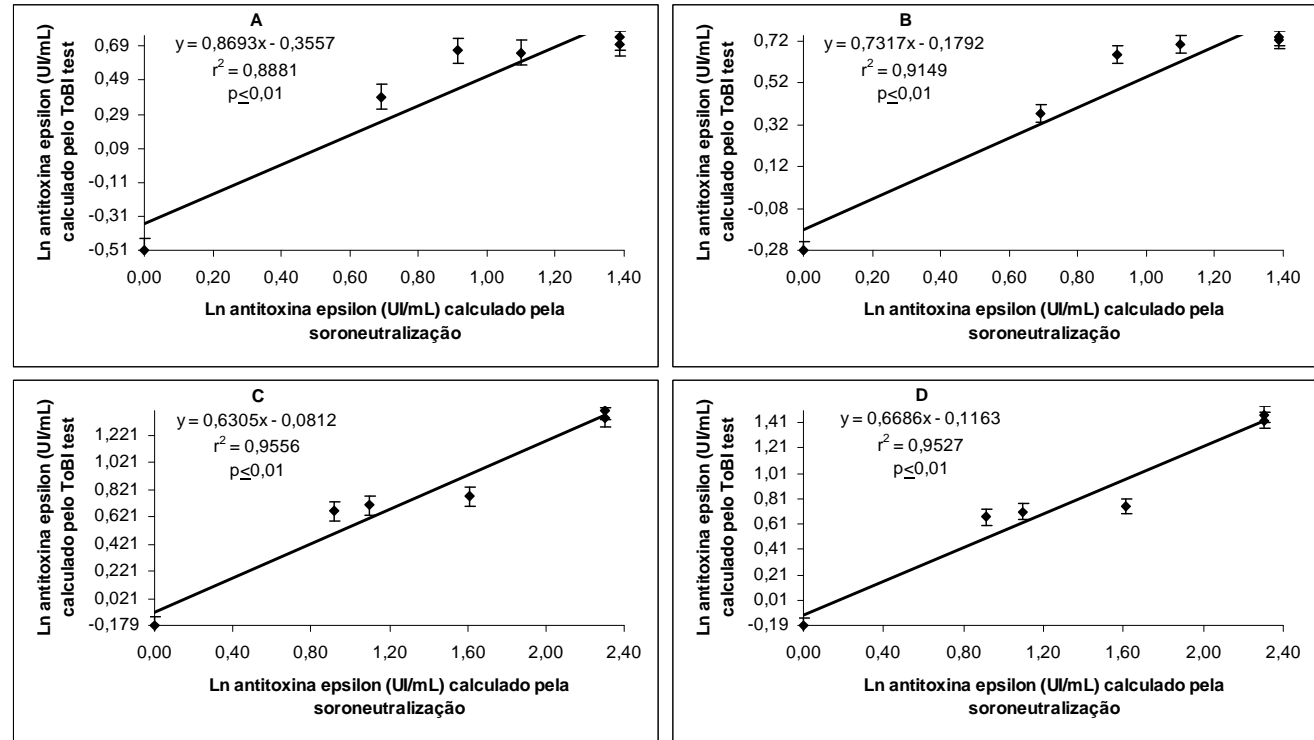


FIGURA 2 – Relação dos títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL), presente em soros de coelhos imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes contra clostridioses, obtidos pelos métodos Soroneutralização e ToBI test modificado. Em (A) e (B), estão representados os resultados dos soros de vacinas polivalentes nas placas 1 e 2, respectivamente. Em (C) e (D), estão representados os resultados dos soros de vacinas monovalentes, nas placas 1 e 2 respectivamente

Observou-se boa correlação variando de 94,23 a 97,75%, entre o ToBI test modificado e a soroneutralização em camundongos, para a titulação de antitoxina epsilon, presente em soro de coelhos, imunizados com vacinas polivalentes e monovalentes contra o *C. perfringens* tipo D. Esse fato corrobora a conclusão de Gun *et al.* (1996), Hendriksen *et al.* (1991) e Fayez *et al.* (2005), que relatam boa concordância (89%) entre os dois métodos, quando utilizaram, na seqüência, soro de camundongo, cobaio e coelhos imunizados contra clostridioses. Segundo esses mesmos autores, o ToBI test apresentou correlação estatisticamente significativa com os testes de desafio em camundongo, indicando mais uma alternativa para esse método, reduzindo o sofrimento dos animais, causado pela técnica agressiva do desafio. Além de contribuir com o bem-estar animal, o ToBI test fornece resultados quantitativos e qualitativos, ao substituir os testes de soroneutralização e desafio respectivamente (HENDRIKSEN *et al.*, 1991).

O princípio do ToBI test, assim como a soroneutralização em camundongo, são baseados na detecção de toxina livre numa mistura de soro + toxina (MATOS *et al.*, 2002). Assim sendo, era esperada precisão e reprodutibilidade do ToBI test, quando comparado com a soroneutralização em camundongo. Neste trabalho, a correlação observada entre o ToBI test e a soroneutralização não difere dos resultados obtidos por Matos *et al.* (2002), que foram de 94,0 e 95,1%, para duas formulações diferentes de vacinas antitetânicas e antidiftéricas, ainda que se tenha utilizado um anticorpo conjugado antiespécie e não um anticorpo conjugado anti-toxina, como relatam os trabalhos abordados na literatura. O ToBI test também foi considerado por Hendriksen *et al.* (1989) como uma alternativa de sucesso, para determinar os níveis de anticorpos diftéricos e tetânicos em soros de humanos e animais.

3.1.4 Elaboração da Curva Padrão para o ToBI test modificado para a análise de soro de carneiro

Para a elaboração da curva padrão para o ToBI test modificado, correlacionaram-se os valores médios de absorbância com seus respectivos

valores de antitoxina epsilon padrão em logaritmo neperiano e a média da porcentagem de inibição das placas.

Os resultados obtidos remetem aos relatos da literatura. A completa inibição da ligação da toxina resulta em alta absorbância, que foi comparável ao controle negativo da prova. A inibição incompleta foi caracterizada pela diminuição do valor da absorbância (HENDRIKSEN *et al*, 1988).

A FIGURA 3 representa a curva padrão, mostrando a correlação existente entre valores de antitoxina epsilon padrão e a porcentagem de inibição das placas do ToBI test.]

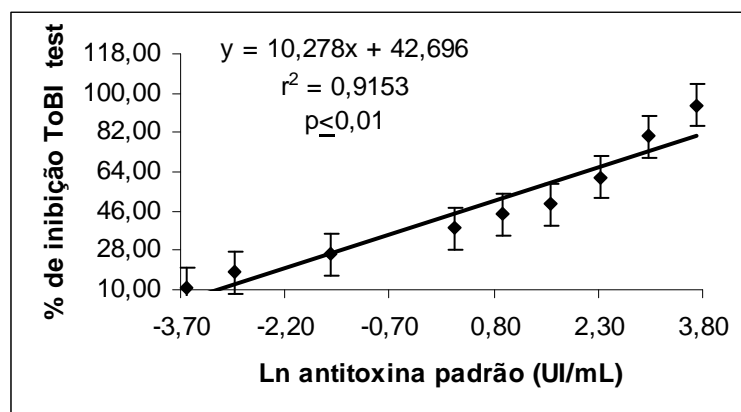


FIGURA 3 – Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da porcentagem de inibição obtidas no ToBI test modificado e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores, em UI/mL, da antitoxina padrão

A curva padrão mostra um coeficiente de correlação igual a 95,67%. Esse coeficiente se apresenta satisfatório, para que a curva seja utilizada posteriormente, na titulação de soros de carneiros imunizados com imunógenos clostridiais.

3.1.5 Verificação da aplicação do ToBI test modificado, avaliando-se soros de carneiros imunizados com vacinas anti-clostridiose

Os resultados da porcentagem de inibição do ToBI test modificado com os respectivos valores de antitoxina epsilon, de soro de carneiro, em logaritmo neperiano estão apresentados na TABELA 3. Esses resultados em LN UI/mL foram inferiores aos resultados obtidos no teste *in vivo*, devido à utilização de soro padronizado não purificado, para ligar-se à toxina, aderida na antitoxina padrão adsorvida na placa. Além disso, o soro utilizado para a referida ligação não teve participação na padronização do teste *in vivo*. No entanto, observa-se que os valores de porcentagem de inibição estão condizentes com os valores de porcentagem de inibição da curva padrão, a partir da qual, os soros foram titulados. Assim, um coeficiente de correlação da curva padrão mais próximo de 100% forneceria resultados mais condizentes com os títulos de antitoxina obtidos *in vivo*. Esse ocorrido pode ser confirmado pelo título da antitoxina padrão purificada que ficou inferior ao resultado esperado de 2 UI/mL, mas que apresentou porcentagem de inibição de 40,04 a 42,23%.

Fayez *et al.* (2005) encontraram resultados similares, obtidos pelas técnicas ToBI test e soroneutralização em camundongo. Os resultados deste trabalho revelaram que os valores de antitoxina mensurados por neutralização da toxina foram 10; 5; 5 e 20 UI, para beta, epsilon, alfa e antitoxina tetânica, respectivamente. Os valores correspondentes obtidos no ToBI test foram 11, 5, 5 e 21, respectivamente.

TABELA 3

Porcentagem de inibição do ToBI test modificado, com respectivos valores de antitoxina epsilon em logaritmo neperiano (Ln UI/mL) e valores de absorbância, obtidos das placas 1, 2, 3 e 4 e o desvio padrão em cada ponto mensurado

Amostra de soro	Média A _{492nm}	% Inibição	Ln UI/mL	UI/mL	Ln UI/mL	UI/mL	<i>in vivo</i> <i>In vitro</i>	DP (δ)
<i>In vitro</i> - Placa 1			<i>In vivo</i>					
S1	1,092	37,617	-0,494	0,610	0,693	2	3,279	0,038
S2	1,034	40,896	-0,175	0,839	0,693	2	2,388	0,048
S3	0,892	48,992	0,613	1,846	1,609	5	2,708	0,018
S4	0,887	49,291	0,642	1,900	1,609	5	2,631	0,029
S5	0,651	62,774	1,954	7,057	2,302	10	1,417	0,017
Padrão	1,049	40,040	-0,258	0,772	0,693	2	2,590	0,077
Média	0,934	46,602	0,380	2,171	1,267	4,333	2,502	0,038
<i>In vitro</i> - Placa 2			<i>In vivo</i>					
S1	1,095	37,422	-0,513	0,599	0,693	2	3,339	0,070
S2	1,051	39,935	-0,269	0,764	0,693	2	2,618	0,055
S3	0,877	49,882	0,699	2,012	1,609	5	2,485	0,012
S4	0,868	50,400	0,750	2,117	1,609	5	2,362	0,015
S5	0,623	64,383	2,110	8,248	2,302	10	1,212	0,093
Padrão	1,019	41,753	-0,092	0,912	0,693	2	2,590	0,076
Média	0,922	47,296	0,448	2,442	1,267	4,333	2,368	0,054
<i>In vitro</i> - Placa 3			<i>In vivo</i>					
S1	1,109	36,637	-0,590	0,554	0,693	2	3,610	0,048
S2	1,043	40,368	-0,227	0,797	0,693	2	2,509	0,047
S3	0,870	50,291	0,739	2,094	1,609	5	2,388	0,014
S4	0,867	50,434	0,753	2,123	1,609	5	2,355	0,016
S5	0,623	64,383	2,110	8,248	2,302	10	1,212	0,093
Padrão	1,011	42,229	-0,045	0,956	0,693	2	2,590	0,030
Média	0,921	47,390	0,457	2,462	1,267	4,333	2,361	0,041
<i>In vitro</i> - Placa 4			<i>In vivo</i>					
S1	1,019	41,753	-0,492	0,611	0,693	2	3,273	0,039
S2	1,052	39,849	-0,277	0,758	0,693	2	2,638	0,054
S3	0,868	50,358	0,745	2,107	1,609	5	2,373	0,016
S4	0,867	50,434	0,753	2,123	1,609	5	2,355	0,016
S5	0,623	64,383	2,110	8,248	2,302	10	1,212	0,093
Padrão	1,021	41,667	-0,100	0,905	0,693	2	2,590	0,031
Média	0,908	48,074	0,457	2,459	1,267	4,333	2,343	0,042

Observa-se, por meio da TABELA 3, que há coerência nos resultados obtidos, pois a porcentagem de inibição se eleva proporcionalmente ao título de antitoxina epsilon, presente nos soros dos carneiros imunizados. Nos soros de maiores títulos de antitoxina epsilon, ocorreram os valores máximos de porcentagem de inibição em todas as placas, sendo o inverso verdadeiro para os menores títulos de antitoxina epsilon.

3.1.5.1 Comparação dos títulos de antitoxina epsilon, presente em soro de carneiro, obtidos pelos métodos ToBI test modificado e soroneutralização em camundongo

A FIGURA 4 representa as curvas de correlação, existente entre os títulos de antitoxina epsilon, presente em soros de carneiros imunizados pelos métodos de soroneutralização e ToBI test modificado.

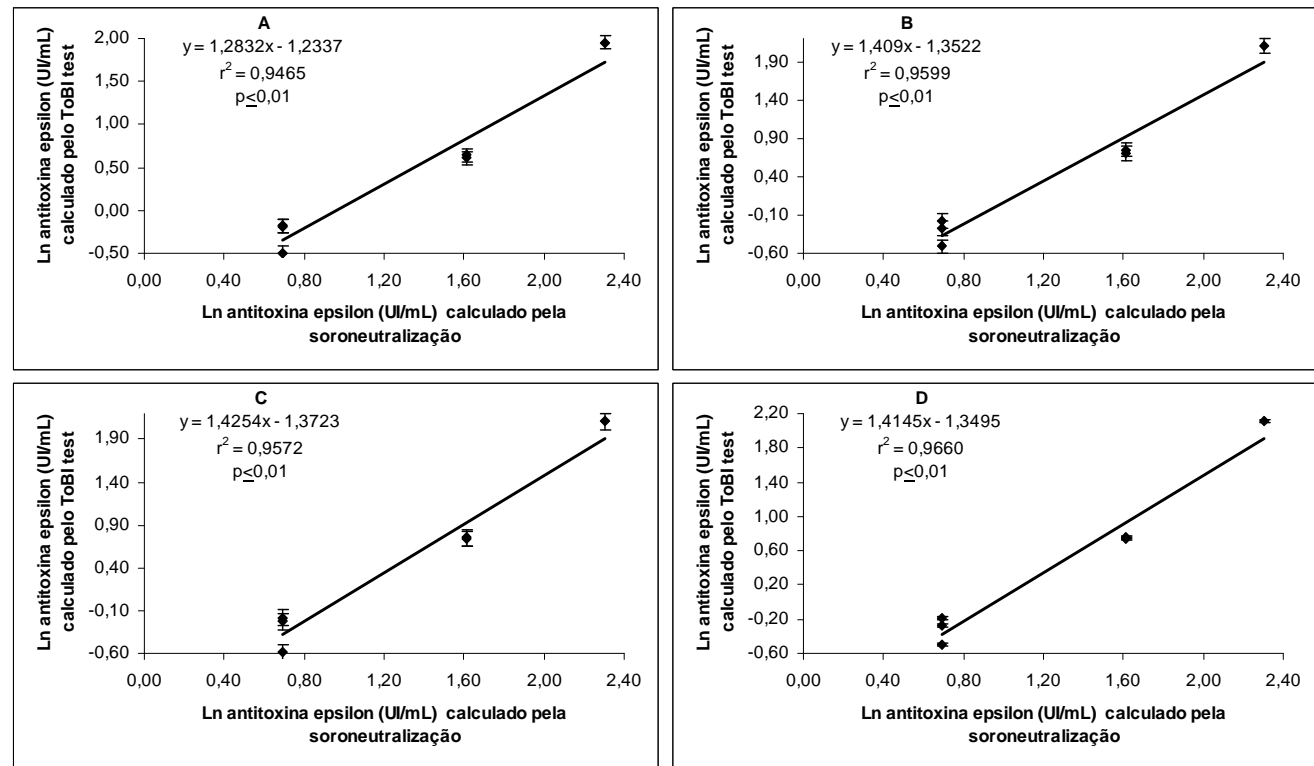


FIGURA 4 - Relação dos títulos de antitoxina epsilon (Ln UI/mL), presente em soros de carneiros, imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos pelos métodos de Soroneutralização e ToBI test modificado nas placas 1, 2, 3 e 4 representados em A, B, C e D, respectivamente.

Coefficiente de correlação maior que 97% confirma relatos da literatura, que afirmam a similaridade entre o ToBI teste e soroneutralização em camundongo, utilizando-se soro de carneiro ou coelhos imunizados, em detectar anticorpos neutralizantes, ao contrário do ELISA, que detecta anticorpos totais (HENDRIKSEN *et al*, 1991, FAYEZ *et al.*, 2005 e SONOBE *et al.*, 2007), fato esse que é essencial para o teste de potência de vacinas.

O coeficiente de correlação encontrado foi similar ao encontrado por Fayez *et al.* (2005), de 99,4%, utilizando-se soro de carneiro imunizado contra a toxina epsilon. Boa correlação (96%) também foi encontrada, quando se utilizaram outros tipos de antígenos, como o diftérico (SONOBE *et al.*, 2007).

Pode-se observar que as maiores correlações são obtidas quando se utiliza soro de carneiros, em comparação aos soros de coelhos. Achado também relatado por Fayez *et al.* (2005), que encontraram coeficientes de correlação iguais a 89 e 99% para soros de coelhos e carneiros respectivamente. Esse fato pode estar relacionado com características próprias da espécie que ainda não foram abordadas pela literatura.

Na TABELA 4, estão apresentados os coeficientes de variação intra e interplaca, obtidos no ToBI test, utilizando-se soro de coelho.

TABELA 4

Coefficiente de variação (CV) dos resultados de titulação de antitoxina epsilon, presente em soros de carneiros imunizados com vacinas contra clostridioses, obtidos em uma mesma placa e em placas diferentes

Amostra Soro	CV(%)	
	Intraplaca	Interplaca
S1	1,923	3,082
S2	2,041	9,717
S3	2,155	8,752
S4	2,683	7,601
S5	3,532	3,779
Padrão	1,201	6,243

No trabalho realizado por Fayez *et al.* (2005), foi encontrado coeficiente de variação intraplaca de 1 a 4% e inter placa de 0 a 36%, ao testarem 10 amostras de soros diferentes, em 5 tempos distintos. No entanto, neste trabalho, o coeficiente de variação apresentou valores inferiores, sendo o intraplaca de 1,201 a 3,532% e 3,779 a 9,717%, para os soros de carneiros imunizados, não apresentando diferença estatística significativa pelo teste F a 1% de probabilidade.

Dentre os benefícios de substituir a soroneutralização em camundongos por metodologias *in vitro*, inclui-se a redução significativa da utilização de animais de laboratório (WEDDELL e WORTHINGTON, 1984), amenizando, dessa maneira, o sofrimento dos animais e diminuindo gastos com experimentos para a avaliação de qualidade de toxóide epsilon e vacinas contra clostridioses (WOOD, 1991). Além disso, os resultados são obtidos em horas ao passo que, com a soroneutralização em camundongo, são necessários dias para obtenção de resultados.

4 CONCLUSÃO

Ao término do trabalho, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- é possível elaborar curvas padrões para a detecção de antitoxina epsilon, com segurança e confiabilidade, uma vez que apresentaram altos coeficientes de correlação, tanto para soro de coelho quanto para soro de carneiro;
- há boa correlação entre o ToBI test e soroneutralização em camundongo, embora os títulos, em UI/mL, tenham sido inferiores na metodologia *in vitro*;
- toxinas e antitoxinas padrões, utilizadas no ToBI test, apresentam títulos mais similares entre as duas metodologias comparadas, quando são purificadas;
- o coeficiente de variação é pouco expressivo, tanto intra quanto interplaca, sugerindo boa repetibilidade e reprodutibilidade do método;
- a metodologia *in vitro*, ToBI test, é apropriada e indicada para a avaliação de potência de vacinas clostridiais, uma vez que apresentou boa correlação com as tradicionais metodologias *in vivo*, utilizadas atualmente, podendo, dessa forma, ser utilizada pelas empresas produtoras de vacinas e órgãos regulatórios como uma alternativa ao teste de soroneutralização, para a determinação de potência de vacinas. No entanto, é necessário o realizar previamente a validação da técnica.

5 REFERÊNCIAS

BONETTI, T. C. S. **Anticorpos antitetânicos e antidiftéricos e resposta a reforço vacinal em mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV-1**. 2002. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Aplicadas à Pediatria) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2002.

BRANDI, I. V. **Avaliação das condições de crescimento de Clostridium perfringens tipo B e da produção de toxinas utilizadas na produção de vacinas veterinárias**. 2000 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

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, Apr. 1992a.

FAYEZ, M. M.; EL-MENISY, A. A.; HUSSEIN, A. Z. In vitro estimation of potency of some clostridial toxoid. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 51 n. 105, p. 368-73 Oct. 2005.

GUN, J. V. D.; AKKERMANS, A.; HENDRIKSEN, C.; DONK, H. V. Validation of the toxin-binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the tetanus toxoid component in vaccines. **Developments in Biological Standardization**, Basel, v. 86, p.199-206, May. 1996.

HENDRIKSEN, C. F. M.; VAN DER GUN, J. W.; MARSMAN, F. R.; KREEFTENBERG, J. G. The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. **Biologicals**, v. 19, p. 23-29, Jan. 1991.

HENDRIKSEN, C. F. M.; V. D. GUN, J. W.; NAGEL, J.; KREEFTENBERG, J.G. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. **Journal of Biological Standardization**, v. 16, p. 287-297, Oct. 1988.

HENDRIKSEN, C. F. M.; GUN, J.W VAN DER; KREEFTENBERG, J.G. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro toxin-binding inhibition (ToBI) test. **Journal of Biological Standardization**. v. 17, p.191-200, Apr. 1989.

MATOS, D. C. S.; MARCOVISTZ, R.; CABELHO, P. H.; GEORGINI, R. A.; SAKAUCHI, D.; SILVA, L. L. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 909-913, Sep. 2002.

PARREIRAS, P. M. **Padronização do teste de ELISA competitivo para detecção de anticorpos contra protoxina epsilon produzida pelo Clostridium perfringens**. 2001. 28 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

SONOBE, M. H.; TREZENA, A. G.; GUILHEN, F. B.; TAKANO, V. L.; FRATELLI, F.; SAKAUCHI, D.; MORAIS, J. F.; PRADO, S. M. A.; HIGASHI, H. G. Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 69-76, Oct. 2007.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. In: **CODE of Federal Regulations**. Washington: United States Department of Agriculture, 2006. Part 113, p. 618-748.

UZAL, F. A.; GLASTONBURY, J. R. W.; KELLY, W. R.; THOMAS, R. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. **Veterinary Record**, v. 141, p. 224-226, Aug. 1997.

WEDDELL, W.; WORTHINGTON, R. W. An enzyme labeled immunosorbent assay for measuring Clostridium perfringens epsilon toxin in gut contents. **Veterinary Journal**, New Zealand, v. 33, n. 9, p. 36-37, Mar. 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, Oct. 1991.

CAPÍTULO 4 - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS *IN VITRO*, ELISA E TOBI (TOXIN BINDING INIBIHITION) TEST MODIFICADO, COM A METODOLOGIA *IN VIVO* TCP (TOTAL COMBINNING POWER) PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE PROCESSOS DE VACINAS CLOSTRIDIAIS

RESUMO

A produção de vacinas clostridiais eficientes é um grande desafio. Para otimizar o processo de produção de vacinas é necessário utilizar metodologias de controle de processos que sejam seguras, sensíveis, específicas, rápidas e economicamente viáveis. Em decorrência do elevado número de vacinas clostridiais comercializadas no Brasil, este trabalho apresentou o objetivo de avaliar e padronizar as metodologias *in vitro*, ELISA e ToBI test modificado, para a análise de toxóide epsilon, em comparação com a metodologia *in vivo* TCP. Foram utilizados os seguintes toxóides epsilon: padrão NIBSC e dos lotes 375/07, 532/08, 551/08, 373/07 e 378/07, os quais foram avaliados por métodos *in vivo*, empregando-se o teste TCP, e *in vitro*, utilizando-se ELISA e ToBI test. A análise do título de toxóide epsilon por meio dos métodos *in vitro* foi realizada, a partir de uma curva padrão, estabelecida previamente e os reagentes utilizados foram devidamente padronizados, para um valor de absorbância próximo de 1, numa faixa espectrofométrica de 0 a 2, em comprimento de onda 492 nm. Ao término do trabalho, os principais resultados mostram que o coeficiente de correlação entre as diluições do toxóide padrão NIBSC e os valores de absorbância de 89,44%, obtidos pelo método ELISA, viabilizam a utilização da curva, para a avaliação de toxóides epsilon. No entanto, verificou-se que os valores de absorbância foram semelhantes para todos os toxóides, não apresentando diferença significativa entre os toxóides mais concentrados e menos concentrado. No ToBI test, o coeficiente de correlação de 96,76%, obtido na curva padrão demonstra a eficiência da curva, para ser utilizada na avaliação do toxóide epsilon. O coeficiente de correlação entre os títulos de toxóide obtidos pelo TCP e ToBI test foi superior que 90%. Assim, conclui-se que o tipo de ELISA utilizado não apresenta poder discriminativo para toxóides com diferentes concentrações, inviabilizando a técnica para esse fim. O ToBI test pode ser utilizado como um método de triagem, sensível e eficaz, para a detecção de toxóide epsilon de *C. perfringens* tipo D.

Palavras chave: Toxóide epsilon. Clostridioses. Ética animal. Método alternativo *in vitro*.

CHAPTER 4 - COMPARISON OF THE *IN VITRO* METHODS, ELISA AND MODIFIED TOBI (Toxin-binding inhibition) TEST, WITH THE *IN VIVO* TCP (Total combining power) FOR THE QUALITY CONTROL OF CLOSTRIDIAL VACCINE PROCESSES

ABSTRACT

Manufacturers of vaccines against *Clostridium perfringens* type D are doing their best in producing vaccines with a certified effectiveness for the Brazilian market. They need process control methods that are safe, sensitive, specific, fast and economically practicable in order to optimize their manufacturing process. Due to the great number of clostridial vaccines that have been traded in Brazil, this study aimed at assessing and standardizing the *in vitro* methods, ELISA and modified ToBI test, in order to verify the potency of epsilon toxicoid in comparison with the *in vivo* TCP method. The following epsilon toxicoids were used: NIBSC standard of the batches 375/07, 532/08, 551/08, 373/07 and 378/07. They were evaluated through the *in vivo* method by using a TCP test; and for the *in vitro* method, ELISA and ToBI tests were used. The analysis of degree of epsilon through *in vitro* methods was performed from a previously established curve pattern, and the reactants used were properly standardized at an absorbance value around 1, at an espectrofometric range from 0 to 2 at a wavelength 492 nm. The results indicate that the correlation ratio between the dilutions of standard NIBSC toxicoid and absorbance values of 89.44%, obtained through ELISA method, proportionate the use of the curve so as to evaluate epsilon toxicoids. However, it was observed that the absorbance values were similar for all toxicoids, presenting no significant difference between higher and less concentrated toxicoids. For ToBI test, the correlation ratio of 96.76, obtained in the curve pattern, demonstrates the effectiveness of the curve so as to be used in the epsilon toxicoid evaluation. The correlation ratio between the titration degrees of toxicoids obtained through TCP and ToBI tests was higher than 90%. It is concluded that the kind of ELISA test used does present discriminative power for toxicoids with different concentrations, what does not proportionate the use of this technique for such finality. ToBI test can be used as a screening method; it is sensitive and effective to detect epsilon toxicoid produced by *C. perfringens* type D.

Key word: Epsilon toxicoid. Clostridioses. Animal ethics. *In vitro* alternative method.

1 INTRODUÇÃO

As vacinas veterinárias bacterianas representam um mercado de aproximadamente US\$ 12 milhões para o segmento de bovinos e de ovinos. Os principais produtos desse segmento são as vacinas contra clostridioses, que representam cerca de 90% do mercado das vacinas bacterianas. Bactérias do gênero *Clostridium* são agentes etiológicos de várias enfermidades em animais, conhecidas como clostridioses (HATHEWAY, 1990). Dada a importância dessas vacinas para o mercado brasileiro, os países são impulsionados a adotar uma tomada de posição mais enérgica em relação ao controle de qualidade dos insumos agropecuários e produtos biológicos, sobretudo em função do intercâmbio comercial internacional. O interesse do mercado nacional e internacional por vacinas contra enterotoxemia justifica a necessidade de desenvolvimento de testes prévios que cheguem a níveis ou a concentrações de toxóides clostridiais a serem utilizados em vacinas.

Para o controle de processo de fabricação de vacinas, utilizam-se métodos de titulação de toxinas que são, geralmente, realizados em camundongos, sendo o mais comum a DL₅₀, Dose Letal 50% (REED e MUENCH, 1938). Há outros métodos de titulação de toxinas, como a DMM (Dose Mínima Mortal) e L+, de acordo com o *Code of Federal Regulations* (UNITED STATES, 2006). Para titulação de toxóides, utilizam-se métodos, como o TCP (*Total Combining Power*), pouco descrito na literatura. Apesar de altamente específico, os testes *in vivo* possuem limitações, com relação à sensibilidade.

O crescente interesse no desenvolvimento de técnicas imunológicas *in vitro*, destinadas ao controle de antígenos clostridiais motivou esse estudo, uma vez que é conhecida a eficácia do método para a detecção da toxina e toxóides e as vantagens quanto à sensibilidade e à rapidez na obtenção dos resultados, assim como ao seu relevante potencial na rotina de produção das indústrias farmacêuticas veterinárias. Fica clara, portanto, a necessidade do desenvolvimento de testes que possam ser feitos com praticabilidade e confiabilidade, pois o biotério, para fornecimento de camundongos, não é

prático, nem de baixo custo e os testes *in vitro* precisam de mais padronizações, para que o uso seja adotado na rotina das empresas produtoras de vacinas.

Os testes *in vitro* têm sido descritos como de fundamental importância para os laboratórios que fabricam vacinas, autoridades de saúde animal e pesquisadores, pois o mercado requer segurança e eficácia dos produtos utilizados. O ELISA, nas suas diversas variações, tem sido utilizado e avaliado por muitos pesquisadores. No entanto, há poucos relatos na literatura que demonstram a avaliação do ToBI test com a finalidade de avaliar antígenos componentes de vacinas clostridiais.

Essas medidas de titulação permitem monitorar a eficiência do processo de produção e das etapas de inativação e de purificação de antígenos. O controle do processo de fabricação, por meio da quantificação do toxóide nas etapas intermediárias e no produto final, permite, na rotina industrial, uma melhoria constante do processo produtivo.

Nesse contexto, esse trabalho teve o objetivo de avaliar e padronizar as metodologias *in vitro*, ELISA e ToBI test, para análise de toxóide epsilon, em comparação ao teste *in vivo* TCP. Os resultados deste trabalho permitirão analisar a viabilidade do uso da técnica ToBI test como metodologia inédita ao controle de qualidade do toxóide.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes utilizados na realização do ELISA direto modificado e ToBI test modificado para o controle de qualidade do processo de vacinas anti-epsilon

Foi utilizado o 2º padrão internacional para a anti toxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (2CpEpsilonAt), preparado e caracterizado pelo Veterinary Laboratories Agency (Weybridge, Surrey, Reino Unido), cuja custódia e distribuição estão a cargo do National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC (Potters Bar, Reino Unido). A toxina epsilon de *Clostridium perfringens* tipo D; produzida em meio sugerido por Brandi (2000), a 37°C, 200 rpm, por 15 horas; foi padronizada ao nível de teste L+/10 (UNITED STATES, 2006). As toxinas foram clarificadas por sistema de filtração tangencial e, em seguida, concentradas por ultrafiltração, sendo, posteriormente, submetidas ao processo de inativação, utilizando-se formol a 37%. Após esse processo de destoxificação, as suspensões foram denominadas de toxóides.

As placas de poliestireno e as placas de imunoensaio, bem como a solução de lavagem (solução de NaCl 0,9% p/v contendo 0,05% de Tween-20), conjugado IgG de carneiro-peroxidase, substrato enzimático ortofenilenodiamino (0,4mg/mL) com peróxido de hidrogênio 30 volumes (0,2 µL/mL), preparado em solução tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e solução 2M H₂SO₄ foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A.

2.2 ELISA direto modificado para a avaliação de toxóide epsilon

A metodologia adotada seguiu as recomendações sugeridas por Uzal *et al.* (1997), com as seguintes adaptações: as placas foram sensibilizadas, colocando-se 100 µL do anticorpo anti-epsilon de soro de coelho (5 UI/mL), diluído 1:2 com tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato (0,05M e pH 9,6), em cada orifício da placa. A diluição a ser utilizada foi estabelecida

previamente. Após o período de incubação de 12 horas a 4 °C, a placa foi bloqueada, com 200 µL de solução de albumina 3%, incubada a 37 °C, por 60 min. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de toxóide teste em cada orifício da placa, incubando a 37 °C, por 60 min. Foram adicionados 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho, diluído em tampão de diluição, incubando a 37 °C, por 60 min e finalmente, foram adicionados 100 µL do substrato enzimático (OPD). O substrato foi preparado, dissolvendo-se 10 mg de OPD (orto-fenilenodiamino) em 25 mL de tampão citrato (0,15M e pH 5), acrescido de 12,5 µL de peróxido de hidrogênio (1:1150 partindo da amostra pura) e incubou-se a 37 °C por 60 min, adicionando, em seguida, 20 µL de ácido sulfúrico (1:20 partindo do puro). Esse substrato foi preparado no momento do uso.

2.3 ToBI test modificado para a avaliação de toxóide epsilon

A metodologia adotada seguiu as recomendações sugeridas por Fayez *et al.* (2005), com as seguintes adaptações: a placa de diluição foi bloqueada, adicionando-se 250 µL solução de albumina 3%. Foi realizada diluição seriada do toxóide na placa de diluição, utilizando-se o fator 2, para um volume final de 100 µL, utilizando-se o tampão de diluição como diluente. Foram acrescentados 100 µL de antitoxina padrão NIBSC, contendo 1UI/mL, em cada um dos orifícios. A placa foi agitada e incubada a 37 °C, em atmosfera úmida, por 60 min.

Na etapa de sensibilização, a placa foi sensibilizada, colocando-se 100 µL antitoxina epsilon padrão NIBSC, diluída em tampão de sensibilização carbonato e bicarbonato (0,05M e pH 9,6), para conter 1UI/mL. Após período de incubação de 12 horas, a 4 °C e lavagem, a placa foi bloqueada, com 200 µL de solução de albumina 3% e incubada a 37 °C, por 60 min. Foram adicionados 100 µL da mistura toxóide e antitoxina padrão NIBSC, diluída em cada orifício da placa, incubou-se a 37 °C, por 60 min. Após a lavagem, foram acrescentados 100µL de anticorpo anti-epsilon de soro de coelho. Por fim, foram adicionados 100 µL de conjugado de anti-soro de coelho diluído em tampão, incubando a 37 °C, por 60 min. Após esse tempo, foram

adicionados 100 µL do substrato enzimático (OPD), preparado, conforme descrito no item 2.2.

2.4 TCP (*Total Combining Power*)

Na avaliação do toxóide epsilon, foi utilizada a metodologia TCP, descrita por Brandi (2007). Foram utilizados seis diferentes toxóides: padrão NIBSC e dos lotes 375/07, 532/08, 551/08, 373/07 e 378/07.

O toxóide epsilon padrão NIBSC, após ter sido submetido à titulação em camundongo, conforme metodologia descrita por Brandi (2007), foi utilizado em oito diluições diferentes, sendo identificados como D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 e D8.

A primeira etapa do TCP foi obtida, realizando diluições seriadas do toxóide, utilizando-se o fator quatro. Em seguida, 0,25 mL de cada uma das diluições foi misturada com 0,25 mL de antitoxina epsilon padrão, contendo 2 UI/mL e mantido à temperatura ambiente, por 1 hora. Após esse período, 0,25 mL de toxina padrão contendo 10 L+/10/mL, foi acrescentado ao tubo contendo toxóide e antitoxina, obtendo uma solução de 0,75 mL. A esse volume foi acrescentado 0,25 mL de salina, para obter um volume final de 1 mL e incubadas à temperatura ambiente por 30 min. e 0,2 mL foi inoculado, via endovenosa, em dois camundongos, por diluição.

Os animais foram observados por um período de sete dias, sendo as mortes registradas em protocolo específico diariamente.

O resultado do TCP foi calculado, com base na diluição do toxóide até a qual todos os camundongos morreram.

A fim de se obter resultados mais precisos, foi realizada a segunda etapa do teste. Essa foi realizada para se determinar a diluição do intervalo entre a diluição em que todos os animais morreram e a diluição em que todos os animais viveram. Foi determinada, preparando-se diluições de 30 em 30%, a partir da diluição da primeira etapa em que todos os camundongos morreram. O intervalo de 30 em 30% foi o menor intervalo conseguido que não se confundissem os limites de morte e vida dos animais, devido à proximidade de diluições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do toxóide epsilon pelos métodos *in vitro*; ELISA direto modificado e ToBI test modificado, e o método *in vivo* TCP

Atualmente, as técnicas empregadas para a avaliação de toxóide epsilon, produzido pelo *C. perfringens* tipo D, se baseiam na neutralização de antitoxina epsilon padrão homóloga pelo toxóide teste, sendo a neutralização determinada indiretamente pelos óbitos de camundongos inoculados com determinada concentração de toxina epsilon. Entretanto, pelo fato de utilizar animais de laboratório, tem trazido discussões éticas, por parte de grupos humanitários. Assim, neste trabalho, avaliaram-se metodologias *in vitro* para a detecção de toxóide epsilon.

3.1.1 TCP (*Total Combining Power*)

O toxóide epsilon utilizado apresentou resultado igual a 2560 TCP/mL na titulação em camundongo. Para a realização das metodologias *in vitro*, utilizou-se o toxóide em oito diluições seriadas, utilizando-se o fator de diluição 2, cujos resultados em TCP/mL se encontram na TABELA 1. Os resultados obtidos pela técnica TCP são descritos pela recíproca da diluição, onde ocorreu a morte dos animais inoculados.

TABELA 1

Títulos de toxóide epsilon padrão NIBSC em diluições seriadas (1:4 a 1:65536), obtidos pela metodologia *in vivo* TCP e o valor correspondente em logaritmo neperiano

Toxóide padrão	TCP / mL	Ln TCP / mL
D1	640	6,461
D2	320	5,768
D3	160	5,075
D4	80	4,382
D5	40	3,689
D6	20	2,996
D7	10	2,303
D8	< 1	0

Em seguida, novos toxóides foram testados para correlacionar com os resultados obtidos pelos testes *in vitro*. Os resultados apresentados na TABELA 1 corroboram os resultados obtidos por Brandi (2007), que, utilizando a Regressão linear, obteve com coeficiente de correlação igual a 0,9999, o que permitiu afirmar que a técnica TCP, para medida do toxóide epsilon, apresenta linearidade até fator de diluição 1:256.

3.1.2 ELISA direto modificado para avaliação de toxóide epsilon

As placas foram sensibilizadas com imunoglobulina de coelho, pura, contendo 5 UI/mL na titulação *in vivo* e em diluições variadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), a fim de obter a concentração que gerasse absorvância próxima de 1 a 492 nm. A FIGURA 1 representa a curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho, em diversas diluições, relacionadas com os valores de absorvância.

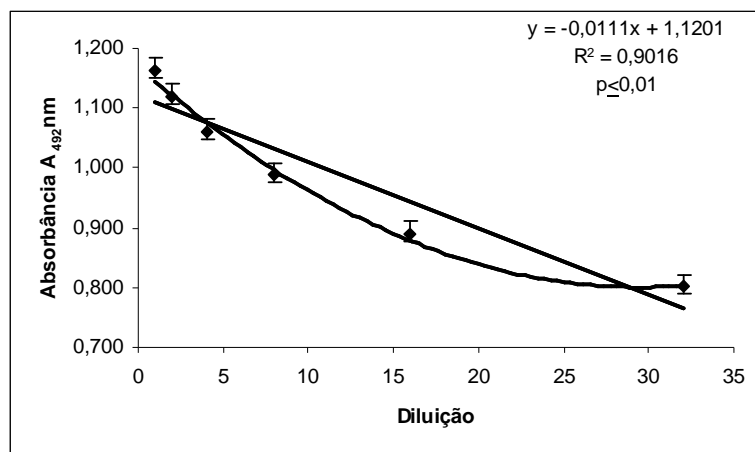


FIGURA 1 – Curva da imunoglobulina anti-epsilon de coelho, utilizada no teste ELISA direto modificado, que mostra a correlação entre os valores de absorbância (492 nm) e a concentração de imunoglobulina presente no soro de coelho, bem como a curva de regressão linear da análise e o desvio padrão em cada ponto mensurado.

Por meio da FIGURA 1, percebe-se que a imunoglobulina anti-epsilon de coelho diluída 1:4 se mostrou eficaz para sensibilizar a placa, gerando absorbância próxima de 1 a 492 nm, quando se utilizou o toxóide padrão NIBSC. No trabalho realizado por El Idrissi e Ward (1992a, b), a diluição de escolha foi 1:8000, o que poderia indicar ser uma antitoxina mais concentrada, no entanto, deve-se levar em consideração que os tipos de ELISA utilizados diferiram entre os trabalhos.

O anticorpo conjugado foi diluído 1:20.000, conforme recomendação do fabricante.

Depois de estabelecida a concentração de imunoglobulina de coelho, capaz de sensibilizar a placa, o toxóide padrão foi diluído em diluições seriadas, utilizando-se o fator dois de diluição para correlacionar com os valores de absorbância e, assim, elaborar a curva padrão.

O coeficiente de correlação entre as diluições do toxóide padrão NIBSC e os valores de absorbância atingiu 89,44%, mostrando correlação satisfatória entre os dois parâmetros, viabilizando a utilização da curva para avaliação de toxóides epsilon, pois valores altos de correlação na curva

padrão originam resultados confiáveis.

Depois de estabelecida a curva padrão, foi possível avaliar diferentes toxóides para comparar com os títulos obtidos pelo TCP. Verificou-se que os valores de absorbância foram semelhantes para todos os toxóides, não apresentando diferença significativa entre os toxóides mais concentrado (375/07) e menos concentrado (378/07). Esses resultados indicam que o teste ELISA realizado não foi capaz de discriminar diferentes quantidades de toxóide na amostra, inviabilizando a técnica para esse fim. É importante mencionar que os toxóides utilizados para avaliação das metodologias *in vitro* apresentaram valores de absorbância próximos uns aos outros, diferindo apenas para o toxóide padrão NIBSC, o qual apresentou um resultado de absorbância mais elevado. Esse fato sugere que amostras submetidas a processo de purificação proporcionam resultados diferentes das amostras que não passaram por tal processo.

Relatos da literatura de que o ELISA para detecção de toxina epsilon é altamente sensível, são apenas parcialmente verdadeiros, uma vez que depende do tipo de ELISA que está sendo utilizado. Por exemplo, o ELISA sanduíche, avaliado por El Idrissi (1992), foi capaz de detectar, de forma linear, concentrações entre 7,8 e 125 ng/mL e o mínimo detectável 2 ng/mL. Nagahama *et al.* (1991) relataram que a sensibilidade do ELISA com anticorpos específicos para a detecção de beta, epsilon e iota toxinas de *C. perfringens* pode chegar a 1,0 mg/mL, para as toxinas beta e iota, purificadas e 0,1 ng/mL de toxina epsilon purificada. Uzal *et al.* (2003) relataram a detecção de 0,075 DL₅₀ / mL de toxina epsilon no conteúdo intestinal. Em um trabalho realizado, comparando-se o ELISA sanduíche e a soroneutralização para a detecção de toxinas beta e epsilon, em conteúdo intestinal, constataram-se sensibilidade e especificidade de 90,5% e 89,2%, para a toxina beta e 97,4% e 94,6%, para a toxina epsilon (EL IDRISSE e WARD, 1992b). Por outro lado, no presente trabalho, utilizando-se um ELISA direto modificado, os resultados não foram promissores. Dessa forma, o teste ELISA, para a detecção de toxina e / ou toxóide apenas será de grande valia para as empresas produtoras de vacinas veterinárias, podendo servir de monitoramento e análise de cultivos de *C. perfringens* tipo D, indicando a

produção e atividade da respectiva toxina (EL IDRISSEI, 1992), depois de se avaliar um tipo de ELISA, capaz de diferenciar títulos de anticorpos, na leitura espectrofométrica.

3.1. 3 ToBI test modificado para a avaliação de toxóide epsilon

A antitoxina epsilon padrão com 8 UI/mL, diluída 1:4 mostrou ser suficiente para sensibilizar as placas e a imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de coelho, conjugada à peroxidase foi utilizada na diluição 1:20.000, conforme recomendação do fabricante.

A imunoglobulina de coelho com 5 UI/mL foi ensaiada pura e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. A diluição escolhida foi a 1:4, para a imunoglobulina de coelho.

Para análise dos toxóides, elaborou-se uma curva padrão, que foi utilizada, juntamente com a análise de cada toxóide. A elaboração da curva foi realizada, utilizando-se o toxóide padrão NIBSC, diluído seriadamente, das diluições de 1:640 a 1:10, utilizando o fator de diluição 2. Um controle negativo também foi utilizado para a elaboração da curva. A FIGURA 2 mostra os valores de absorbância, obtidos em cada uma das concentrações de toxóide, analisadas pelo ToBI test.

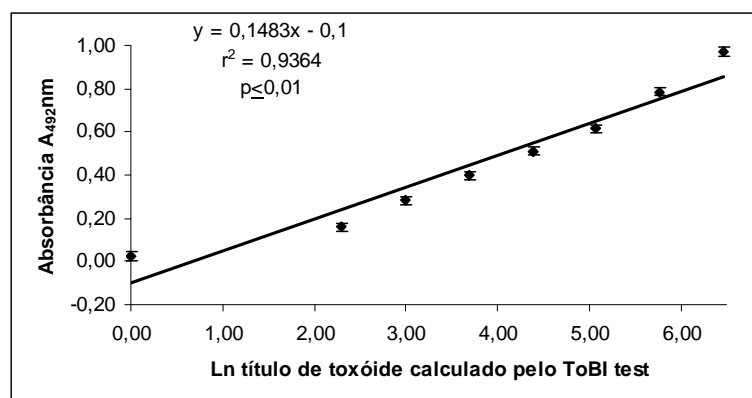


FIGURA 2 – Curva padrão que mostra a correlação entre os valores da absorbância (A_{492nm}) no ToBI test e o logaritmo neperiano (Ln) dos valores, em TCP/mL, de toxóide epsilon.

O coeficiente de correlação de 96,76%, obtido na curva padrão pela regressão linear simples, demonstra a eficiência da curva para ser utilizada na avaliação dos toxóide epsilon. O coeficiente de correlação elevado em uma curva padrão permite maior segurança em concluir que o aumento dos valores de absorvância corresponde a uma maior concentração de toxóide epsilon. As repetições das análises para a elaboração da curva foram semelhantes entre si, com um desvio padrão, não atingindo 1%. Esse achado garante a homogeneidade dos resultados, sugerindo que uma curva padrão previamente elaborada pode 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 realizados controles negativos e positivos, para garantir a qualidade dos reagentes e a eficiência do operador.

Depois de estabelecida a curva que representa a correlação existente entre os títulos de toxóide e os valores de absorvância, seis diferentes toxóides epsilon foram avaliados pelo ToBI test modificado, cujos resultados estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2

Títulos de toxóide epsilon (TCP/mL) em logaritmo neperiano, pelo método de ToBI test, nas placas 1, 2 e 3, com os respectivos valores de absorbância e o desvio padrão em cada ponto mensurado

Toxóide	A _{492nm}	Ln TCP/ml	TCP/mL	Ln TCP/ml	TCP/mL	<i>In vitro</i> <i>in vivo</i>	DP (δ)
<i>In vitro</i> - Placa 1				<i>In vivo</i>			
padrão	1,982	14,041	1.252.936	7,848	2560,00	489,00	0,046
375/07	1,985	14,058	1.274.418	7,848	2560,00	497,80	0,016
551/08	1,415	10,216	27.337,00	7,313	1500,00	18,220	0,030
532/08	1,113	8,178	3.562,00	7,031	1131,00	3,150	0,019
373/07	0,894	6,705	816,00	6,215	500,00	1,630	0,017
378/07	0,624	4,881	132,00	5,075	160,00	0,825	0,018
Média	1,336	9,680	426533,50	5,580	1401,833	168,438	0,024
<i>In vitro</i> - Placa 2				<i>In vivo</i>			
padrão	1,976	13,998	1.200.201	7,848	2560,00	489,00	0,017
375/07	1,975	13,990	1.190.638	7,848	2560,00	465,09	0,016
551/08	1,425	10,280	29.144,00	7,313	1500,00	19,430	0,010
532/08	1,122	8,238	3.7820,00	7,031	1131,00	3,340	0,006
373/07	0,884	6,637	763,00	6,215	500,00	1,530	0,017
378/07	0,631	4,927	138,00	5,075	160,00	0,862	0,127
Média	1,336	9,678	404111,00	5,580	1401,833	168,438	0,032
<i>In vitro</i> - Placa 3				<i>In vivo</i>			
padrão	1,985	14,058	1.274.418	7,848	2560,00	489,00	0,037
375/07	1,983	14,046	1.259.216	7,848	2560,00	491,88	0,024
551/08	1,420	10,246	28.170	7,313	1500,00	18,780	0,012
532/08	1,118	8,211	3.681,00	7,031	1131,00	3,250	0,006
373/07	0,892	6,689	803,00	6,215	500,00	1,610	0,013
378/07	0,622	4,869	130,00	5,075	160,00	0,810	0,014
Média	1,337	9,687	427736,33	5,580	1401,833	168,438	0,018

Na literatura, são ausentes trabalhos que utilizam o ToBI test, com a finalidade de avaliar toxóide destinado à produção de vacinas veterinárias.

Os resultados da titulação dos toxóides experimentais, em TCP/mL, estão apresentados na TABELA 2.

Os resultados apresentados na TABELA 2 mostram que a técnica TCP permite avaliar toxóides em diferentes concentrações, quando esses são submetidos a valores médios de temperatura, pH, tempo de reação da antitoxina com toxóide e tempo de reação da toxina com a mistura toxóide e toxina, iguais a 37 °C, 7, 60 min. e 30 min, respectivamente. Resultados obtidos por Brandi (2007) mostram que é possível quantificar amostras com elevadas concentrações de toxóide, por meio de diluição seriada da amostra. Esse autor ainda concluiu que o toxóide pode ser quantificado em dias distintos, no prazo de até seis dias, sem que haja perda do título desse nesse período. A técnica apresentou caráter robusto, uma vez que foi comprovado que a amostra pode ser titulada tanto a 34, 37 e 40 °C, nos valores de pH de 6,7 a 7,7 e nos tempos de reação 40, 60 e 80 minutos da antitoxina com toxóide, sem variação no resultado, bem como nos tempos de reação 10, 30 e 50 min da reação toxina com toxóide e antitoxina.

Os resultados apresentados na TABELA 2 estão condizentes com o esperado, uma vez que a concentração de toxóide foi diretamente proporcional aos valores de absorbância. Verifica-se, pelos resultados apresentados, que o ToBI test foi mais sensível que a metodologia *in vivo* TCP, uma vez que os valores de títulos de toxóide obtidos pelo ToBI test foram quase 500 vezes maiores que os resultados obtidos pela titulação *in vivo*. Essa sensibilidade diminui, na medida em que a concentração de toxóide diminui, sendo que, no toxóide do lote 378/07, os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* foram muito semelhantes. Quando a concentração de toxóide é elevada, os valores de absorbância ficaram muito próximos ao limite máximo da faixa de leitura a 492 nm no espectrofotômetro, que é de 0 a 2, aumentada a probabilidade de erro. Dessa forma, para amenizar esse fato, recomenda-se diluir a amostra de toxóide, de modo que o valor de absorbância fique próximo de 1. Neste trabalho, essa ação foi realizada, diluindo-se o toxóide com título de 2560 TCP/mL *in vivo*, por um fator de

diluição 1:4. Obtiveram-se valores de absorbância entre 0,800 e 0,900, correspondendo a valores de TCP de 432 a 848, que são valores próximos aos valores obtidos *in vivo*.

O coeficiente de variação intraplaca variou de 0,502 a 8,447%, enquanto o interplaca foi de 4,892 a 14,032%.

A FIGURA 3 representa as curvas de correlações existentes entre o ToBI test, modificado para a análise de toxóide e a titulação *in vivo*, utilizando-se camundongo.

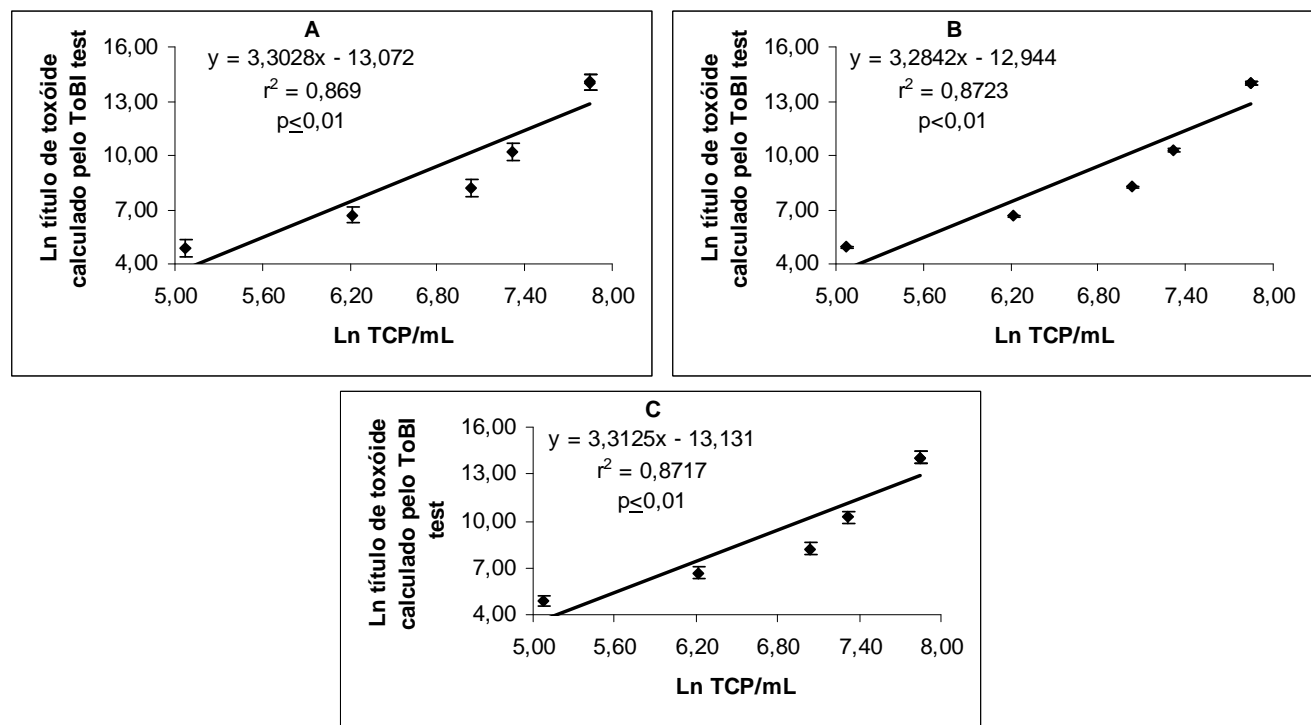


FIGURA 3 – Relação entre os títulos de toxóide epsilon (Ln TCP/mL), obtidos pelos métodos TCP *in vivo* e ToBI test, modificado nas placas 1, 2 e 3, representadas em A, B e C, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que o referido teste pode ser utilizado como um método de triagem, sensível e eficaz para a detecção de toxóide epsilon. Os bons resultados obtidos na padronização dessa técnica de análise de toxóide epsilon remetem ao seu aprimoramento para a utilização como opção futura aos bioensaios, contribuindo para a redução do número de animais utilizados. O ToBI test modificado para a análise de toxóide epsilon necessita ser testado, frente a um número maior de amostras, para que o seu desempenho seja avaliado com maior segurança, a fim de disponibilizá-lo às indústrias produtoras de vacinas clostridiais. A implementação de um teste como esse em um programa interno bem definido pelas empresas poderia contribuir para a utilização de antígenos vacinais de boa qualidade e viáveis para serem utilizados em vacinas. Outra aplicação desse teste seria a avaliação do produto final, tanto pelas empresas produtoras quanto pelas autoridades fiscalizadoras de produtos veterinários.

4 CONCLUSÃO

Ao término do trabalho foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- amostras submetidas a processo de purificação proporcionam resultados diferentes das amostras que não passaram por tal processo;
- o teste ELISA realizado é capaz de discriminar diferentes quantidades de toxóide na amostra, inviabilizando a técnica para esse fim;
- o teste ELISA para detecção de toxina e / ou toxóide apenas é eficiente para as empresas produtoras de vacinas veterinárias, depois de se avaliar um tipo de ELISA, capaz de diferenciar títulos de anticorpos na leitura espectrofométrica;
- o ToBI test apresenta correlação satisfatória com a metodologia *in vivo*, TCP;
- o ToBI test pode ser utilizado como um método de triagem, sensível e eficaz para a detecção de toxóide epsilon, produzido pelo *C. perfringens* tipo D.

5 REFERÊNCIAS

BRANDI, I. V. **Avaliação das condições de crescimento de Clostridium perfringens tipo B e da produção de toxinas utilizadas na produção de vacinas veterinárias**. 2000. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

BRANDI, V. B. **Desenvolvimento e análises de validação de metodologias para o controle de processo de purificação e fabricação de vacinas contra Clostridium perfringens tipo D**. 2007. 160 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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, Apr. 1992a.

EL IDRISSEI, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 389-396, June. 1992b.

FAYEZ, M. M.; EL-MENISY, A. A.; HUSSEIN, A. Z. In vitro estimation of potency of some clostridial toxoid. **Assiut Veterinary Medical Journal**. v. 51, n. 105, p. 368-373, Oct. 2005.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic Clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, Jan. 1990.

NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S.; SAKURAI, J. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from Clostridium perfringens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 68, n. 1, p. 41-44, Nov.1991.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, Sep.1938.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. Clostridium Perfringens Type D Toxoid and Bacterin-Toxoid. In: **CODE of Federal Regulations**. Washington: United States Department of Agriculture, 2006. p. 665-666.

UNITED STATES. United States Department of Agriculture. In: **CODE of Federal Regulations**. Washington: United States Department of Agriculture, 2006. Part 113, p. 618-748.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; THOMAS, R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 16, p. 94-99, Oct. 2003.

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, Sep. 1997.

CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA TÉCNICA LIMITE DE FLOCULAÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS CLOSTRIDIAIS

RESUMO

Dentre as doenças causadas pelos diversos tipos de *Clostridium perfringens*, as enterotoxemias merecem destaque pela sua letalidade, principalmente em animais jovens, e inviabilidade de tratamentos. O controle e profilaxia são garantidos por medidas de manejo e vacinação sistemática do rebanho, já que os animais estão em contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades. Baseado em razões éticas e por necessidade de desenvolver técnicas viáveis e eficientes para mensurar potência de vacinas clostridiais, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e padronizar o teste *in vitro* Limite de Floculação, para ser utilizado no controle de qualidade de vacinas contra enterotoxemia, em comparação com o teste de soro neutralização e análise de toxóide em camundongo. Foram utilizadas vacinas experimentais contra enterotoxemia e toxóides produzidos pelo *Clostridium perfringens* tipo D, previamente avaliados por métodos *in vivo*, empregando-se os testes de soroneutralização em camundongo e TCP. A técnica Limite de Floculação consistiu em colocar volumes variados de anticorpos em uma série de sete tubos de ensaio e, em seguida, foi adicionado 1 mL de toxóide em cada um dos tubos. O primeiro tubo a flocular foi dito como sendo o que continha a quantidade mais próxima de antitoxina equivalente à quantidade de antígeno na amostra e se propôs que o Lf contido no tubo foi unidade de Lf da amostra testada. Ao término do trabalho, os principais resultados obtidos indicaram que o nível mínimo de antitoxina detectável em soros de coelhos e carneiros pela técnica limite de floculação é 10 UI/mL. A técnica Limite de Floculação é linear frente a diluições seriadas da amostra, gerando um coeficiente de correlação 99,93%. O coeficiente de correlação, obtido entre os títulos de toxóide pelos métodos TCP e Limite de floculação foi 99,97%. Assim, conclui-se que o Limite de Floculação é satisfatório para substituir os tradicionais métodos *in vivo* utilizados na análise de toxóide epsilon, destinados à produção de vacinas veterinárias, sendo promissora para substituir tais metodologias, pois é um teste simples, rápido e econômico. No entanto, a referida técnica é pouco eficiente para ser utilizada no teste de potência de vacinas contra enterotoxemia, em substituição à soroneutralização em camundongos.

Palavras chave: Clostridioses. Metodologias *in vitro*. Teste de potência. Análise de toxóide epsilon.

CHAPTER 5 - EVALUATION OF THE 'LIMIT OF FLOCCULATION' TECHNIQUE IN THE QUALITY CONTROL OF CLOSTRIDIAL VACCINES

ABSTRACT

Among diseases caused by several types of *Clostridium perfringens*, enterotoxemias deserve special attention due to their lethality, particularly in young animals, and due to the unfeasibility of treatment. Control and prophylaxis are guaranteed through measures of herd management and its systematic vaccination since the animals are in contact with the agents and with the factors that may trigger the illnesses. Based on ethics reasons and on the need for developing feasible and effective techniques to measure the potency of clostridial vaccines, this study was carried out aiming at assessing and standardizing the 'Limit of Flocculation' *in vitro* test to be used for the quality control of vaccine against enterotoxemia in comparison with the serum neutralization test and analysis of toxicoid in mice. This study used experimental vaccines against enterotoxemia and toxoids produced from the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D previously evaluated by *in vivo* methods, by using the test of serum neutralization in mice and TCP test. The 'Limit of Flocculation' technique has consisted of inserting varied volumes of antibodies in a series of seven test tubes; then one mL of toxicoid was added to each tube. The first tube to flocculate was considered to be the one that had the closer quantity of antitoxin equivalent to the quantity of antigen in the sample; it was proposed that the Lf held in the tube would be the unit of Lf of the tested sample. At the end of the study, the main results indicated that the lower degree of antitoxin detectable both in rabbit and in sheep serum through the 'Limit of Flocculation' technique is 10 UI/mL. The 'Limit of Flocculation' technique is linear comparing to sample serial dilutions, what provides a correlation ratio of 99.93. The correlation ratio obtained from the degrees of toxoids through TCP and 'Limit of Flocculation' methods was 99.97%. Consequently, it is concluded that the Limit of Flocculation is suitable to replace traditional *in vivo* methods for the analysis of epsilon toxoids that are used for the production of veterinary vaccines. It is promising for replacing such methods, since it is a simple, effective, fast and inexpensive test. Nevertheless, the referred technique is little effective to be used for the potency test of vaccines against enterotoxemia in substitution to serum neutralization in mice.

Key words: Clostridiosis. *In vitro* methods. Potency test. Epsilon toxicoid analysis.

1 INTRODUÇÃO

A enterotoxemia é uma das mais importantes enfermidades que acometem os ruminantes em todo o mundo. A grande maioria dos animais acometidos vai a óbito. Entretanto, os poucos animais que se recuperam permanecem, por toda a vida, com um baixo desenvolvimento. Dessa forma, as medidas de prevenção e controle são necessárias, para que se possa evitar grandes perdas no rebanho. Na profilaxia da enterotoxemia, duas medidas são ressaltadas, por serem de grande importância, quais sejam, a vacinação de todo rebanho e o manejo alimentar adequado. Devido à apresentação aguda da enfermidade, a vacinação é o procedimento usual. Tendo em vista a necessidade das vacinas para a prevenção da enterotoxemia, o controle de qualidade das vacinas e o necessário acompanhamento por parâmetros científicos devem ser alvo de estudos, ficando evidente que cabe à pesquisa testar diferentes metodologias que possam atestar a eficiência das vacinas de forma confiável, prática e viável.

A necessidade de reduzir ou eliminar testes em animais levou a um aumento, em todo mundo, da investigação e do desenvolvimento de técnicas *in vitro* que apresentam vantagens em relação aos testes *in vivo*. Além de evitar questionamentos bioéticos, os testes *in vitro* são rápidos, específicos, sensíveis e com viabilidade econômica maior que a utilização de camundongos (EL IDRISSE e WARD, 1992).

Testes alternativos serão de grande benefício e resultarão em substancial redução de número de animais utilizados no teste de potência de vacinas contra enterotoxemia, causada pela toxina epsilon de *C. perfringens* tipo D. A técnica limite de floculação é uma boa alternativa para substituir os métodos *in vivo* de controle de qualidade de vacinas, sendo de fácil execução, direto, rápido e econômico, o que faz com que seja uma técnica muito conveniente, para substituir a utilização de animais nas análises de controle de qualidade de vacinas (SPAUN e LYNG, 1970).

A técnica limite de floculação se baseia na reação antígeno-anticorpo em nível ótimo e pode ser utilizada para mensurar anticorpos em soros de animais imunizados, bem como quantificar e qualificar amostras de toxinas

e/ou toxóides a serem utilizados em vacinas. Os estudos mostraram que a técnica limite de floculação tem importante potencial para ser aplicada nas áreas de controle de processo e de fabricação de vacinas.

Apesar de todas as vantagens advindas da utilização de técnica limite de floculação, em substituição aos tradicionais métodos *in vivo*, Iwaki *et al.* (2007) relatam que as análises que envolvem leituras visuais são demasiadamente subjetivas, apresentando baixa reprodutibilidade, devido à grande variação de pessoa para pessoa.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar e padronizar a técnica de Limite de Floculação e comparar a sensibilidade da mesma com a soroneutralização em camundongo, na titulação de anticorpos vacinais, frente ao toxóide epsilon, e TCP, na avaliação de toxóide epsilon.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Titulação de antitoxina epsilon em soro teste de coelhos e carneiros imunizados contra *Clostridium perfringens* tipo D, pelo método *in vitro* – Limite de flocculação (Lf)

Definiu-se como a unidade de flocculação (Lf) a quantidade de toxina que floccula mais rapidamente com uma unidade de antitoxina no tempo que se transcorre para o aparecimento dos flóculos, designada como Kf a constante de flocculação.

O toxóide epsilon padrão NIBSC foi previamente titulado frente a uma antitoxina padronizada contendo 100 Lf/mL. Dessa forma, foi possível quantificar o toxóide na unidade Lf. O toxóide foi diluído para conter 100 Lf/mL. Em seguida, seguiu-se o recomendado por Ramón (1922), para a titulação de antitoxina epsilon, presente nos soros dos animais imunizados. Volumes variados de soro teste de animais imunizados foram dispensados em uma série de sete tubos de ensaio e, em seguida, foi adicionado 1 mL de toxóide padrão, contendo 100 Lf/mL, em cada um dos tubos. Os tubos foram imersos em um banho de água a 45°C e observados em intervalos regulares até o aparecimento do primeiro flóculo, com a ajuda de lentes de aumento e iluminação. O primeiro, segundo e terceiro tubo contendo a mistura que flocculou foram anotados, assim como o tempo requerido para a flocculação do primeiro tubo. O primeiro tubo a floccular foi dito como sendo o que continha a quantidade mais próxima de antitoxina, equivalente à quantidade de antígeno na amostra e se propôs que o Lf contido no tubo foi a unidade de Lf do soro teste. O tempo transcorrido para que ocorra a primeira flocculação (Kf) foi um indicativo da qualidade do antígeno.

Para cálculo dos volumes variados de soros utilizados, adotou-se a seguinte equação:

$$\text{Vol. soro (mL)} = \frac{\text{Título toxóide padrão (Lf/mL)}}{\text{Título estimado (Lf/mL)} \times \text{Diluição do soro}}$$

A leitura da prova foi realizada visualmente e o resultado foi o valor estimado para o primeiro tubo onde ocorreu a floculação. Nesta etapa do trabalho, utilizaram-se soros dos coelhos e carneiros, imunizados com as vacinas clostridiais, previamente titulados *in vivo*, apresentando títulos, conforme TABELA 1.

TABELA 1

Títulos de antitoxina epsilon, nos soros de coelhos e carneiros imunizados, obtidos por soroneutralização em camundongo

Soro coelho	Título (UI/mL)	Soro carneiro	Título (UI/mL)
1	4	1	2
2	1	2	2
3	4	3	5
4	2	4	5
5	3	5	10
6	5	-	-
7	10	-	-
8	10	-	-
9	1	-	-
10	3	-	-

2.2 Limite de floculação (Lf) para a avaliação de toxóide epsilon

Primeiramente, padronizou-se uma antitoxina epsilon de soro de coelho para conter 100 Lf/mL, utilizando-se o toxóide epsilon padrão NIBSC contendo 100 Lf/mL. A padronização da antitoxina foi realizada, tomando-se por base a similaridade entre as unidades UI e Lf. Adotaram-se para este trabalho valores de Lf com sendo $\pm 30\%$ do valor do título de antitoxina em UI.

Em seguida, para a titulação do toxóide teste utilizou-se a técnica de Ramón, conforme descrito no item 2.1, diferenciando-se apenas pela equação para cálculo dos volumes variáveis de soro padrão utilizado, conforme a seguir:

$$\text{Vol. soro (mL)} = \frac{\text{Título estimado (Lf/mL) / Diluição do toxóide}}{\text{Título do soro padrão (Lf/mL)}}$$

Para avaliar a eficiência do teste em quantificar e qualificar o toxóide epsilon, foram utilizadas as seguintes amostras: toxóide epsilon padrão NIBSC diluído (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 e D8) e toxóide lotes 375/07, 532/08, 551/08, 373/07 e 378/07, cujos títulos, obtidos pela metodologia *in vivo* TCP, se encontram apresentados na TABELA 2.

Os testes com cada toxóide foram realizados 3 vezes, para verificar a variabilidade do teste.

A leitura do teste foi realizada visualmente e o resultado obtido foi o estimado para o tubo onde primeiro ocorreu a floculação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Verificação da aplicação do Limite de Floculação, avaliando-se soros de coelhos e carneiros, imunizados com vacinas anti-clostridiose

Durante a realização deste trabalho, observou-se que os títulos mínimos de anticorpos, presentes tanto em soro de coelho quanto de carneiro, detectáveis pelo limite de floculação é 10 UI/mL, uma vez que apenas o soro dos carneiros obtidos na sangria do dia 5 e soros de coelhos vacinados com as monovacinas 7 e 8, foi possível visualizar floculação, após 2 horas e 40 (\pm 3 minutos) de reação.

Nos demais soros testados, não foi visualizada floculação em nenhum dos tubos, sugerindo que a técnica limite de floculação não é indicada para mensurar baixos títulos de anticorpos em soro de animais imunizados. Se o fenômeno de floculação ocorrer nessas baixas concentrações de anticorpos, os flóculos não são visíveis a olho nu ou o tempo requerido para ocorrer tal fenômeno é superior a 12 horas, que foi o tempo destinado à realização dessa prova neste trabalho. Após esse tempo, os tubos foram descartados, uma vez que não seria viável padronizar a técnica com longo período de tempo até obter os resultados, pois o mais importante não é perceber a floculação, mas o primeiro tubo onde ocorreu a formação dos flóculos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a técnica limite de floculação é pouco sensível para mensurar baixos títulos de anticorpos, em decorrência da forma de leitura, que é realizada a olho nu.

3.2 Verificação da aplicação do Limite de floculação (Lf) para análise de toxóide epsilon

Técnica de Limite de floculação de Ramon foi primeiramente realizada, utilizando-se o toxóide padrão NIBSC em diversas diluições, cujos resultados em Lf/mL estão apresentados na TABELA 2. O soro padrão utilizado tinha título de antitoxina epsilon conhecido igual a 100 Lf/mL.

TABELA 2

Títulos de toxóide epsilon padrão NIBSC, em diluições seriadas, obtidos por meio do método *in vitro* Limite de floculação

Toxóide padrão	Lf / mL	TCP / mL	<i>In vivo/in vitro</i>
D1	700	640	1,09
D2	350	320	1,09
D3	175	160	1,09
D4	90	80	1,12
D5	45	40	1,12
D6	20	20	1,00
D7	10	10	1,00
D8	-	< 1	-

A amostra denominada D1 apresentou resultado similar à análise *in vivo* (TCP/mL = 640), conforme pode ser observado na TABELA 2. Os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* não diferenciaram pelo teste F a 1% de probabilidade.

O tempo (Kf) decorrido do início da reação até o aparecimento da floculação não foi muito diferente entre as amostras de toxóides nas variadas concentrações. O tempo para que pudesse ser visualizada a floculação variou de 28 a 33 minutos, não obedecendo a nenhuma ordem de concentração. Os valores elevados de Kf indicam fraco poder de combinação entre antígeno e anticorpo. Assim, pode-se relacionar uma floculação lenta com baixa avidéz da antitoxina.

Com os resultados apresentados na TABELA 2, foi possível avaliar a linearidade do método, quando se utilizam diluições seriadas da amostra a ser testada. A FIGURA 1 ilustra a curva de linearidade, obtida a partir das análises de limite de floculação, em diferentes diluições.

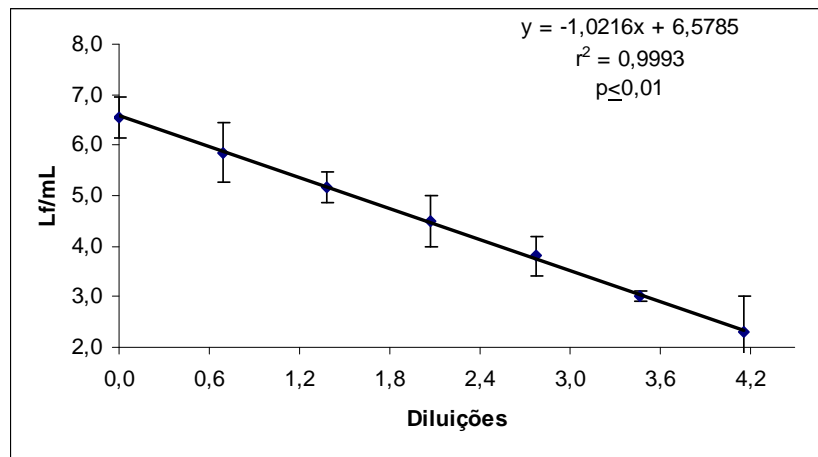


FIGURA 1 – Curva que mostra a Linearidade da técnica limite de floculação em diluições seriadas

Pelos resultados apresentados, verifica-se que a técnica limite de floculação é linear, frente a diluições seriadas da amostra, gerando um coeficiente de correlação 99,96%. O coeficiente de correlação encontrado é semelhante ao encontrado por Brandi (2007), ao avaliar a linearidade de técnica *in vivo*, TCP. Os resultados obtidos neste trabalho permitem, assim, utilizar a técnica de limite de floculação, em substituição ao TCP, sem que ocorra diminuição na confiabilidade dos resultados, quando se utilizam diluições seriadas para a semiquantificação da amostra de toxóide epsilon analisada.

Na comparação das metodologias *in vivo* e *in vitro* para a avaliação de toxóide epsilon, encontrou-se coeficiente de correlação de 99,97% (FIGURA 2).

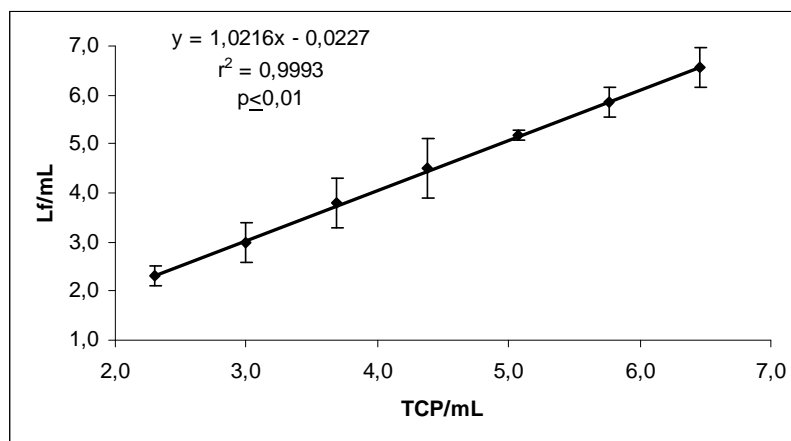


FIGURA 2 – Curva que representa a relação entre os títulos de toxóide obtidos por TCP e Limite de floculação

O coeficiente de correlação, obtido entre os títulos de toxóide pelos métodos TCP e Limite de floculação foi 99,97%, indicando mais uma vez que o método *in vivo* pode ser substituído pelo método *in vitro* sem perda de confiabilidade dos resultados. Corroborando o relato de Spaun e Lyng (1970), a relação entre os métodos *in vivo* e *in vitro* foi próxima de 1, indicando ser uma técnica alternativa viável para a análise de toxóide epsilon. Spaun e Lyng (1970) obtiveram resultados iguais a 1,40 e 1,36, em média, para a relação *in vivo* / *in vitro* relativa e absoluta, respectivamente, quando titularam antitoxina tetânica, identificada como TE 6/66/2.

Em seguida, avaliaram-se mais cinco toxóides diferentes, a fim de correlacionar com a titulação pela técnica TCP *in vivo*. Os resultados expressos em Lf/mL estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3

Títulos médios de toxóide epsilon dos lotes 532/08, 551/08, 375/07, 373/07, 378/07, obtidos por meio do método Limite de floculação e a relação entre resultados obtidos por meio dos métodos *in vivo* e *in vitro*

Toxóide	Lf / mL	TCP / mL	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
Padrão NIBSC		640	
532/08	1100	1131	1,03
551/08	1300	1500	1,15
375/07	2500	2560	1,02
373/07	500	500	1,00
378/07	150	160	1,07

Pelos resultados apresentados na TABELA 4, verifica-se que a relação *in vivo* / *in vitro* atingiu no máximo 1,15, revelando a proximidade dos resultados obtidos pelas técnicas *in vivo* e *in vitro*. Nas duas metodologias, a relação antígeno/anticorpo deve ser ótima, de forma a culminar com o surgimento dos resultados, seja por observação de morte de camundongos ou formação de flóculos. O grau de avidéz da antitoxina pode influenciar na relação *in vivo/in vitro*, uma vez que uma antitoxina com baixa avidéz flocula melhor do que neutraliza. Assim, a relação *in vivo/in vitro* é mais próxima de 1, quanto maior for a sua avidéz. Dessa forma, sugere-se que a antitoxina padrão utilizada na técnica limite de floculação tenha valores altos de avidéz, de forma a reproduzir com mais fidelidade o que se observa *in vivo*. Os resultados encontrados neste trabalho foram inferiores aos obtidos por Spaun e Lyng (1970) e superiores aos encontrados por Orleans *et al.* (1960).

As análises foram realizadas 3 vezes, mas não foi encontrada variação nos resultados obtidos, discordando dos resultados obtidos por Spaun e Lyng (1970). A diferença dos resultados pode ser atribuída ao fato de que, no presente trabalho, foram utilizadas antitoxinas padronizadas com 100 UI/mL e temperatura de reação fixa de 45 °C. Ao contrário do que indica a literatura (WEISS; WEISS, 1988), os reagentes utilizados não precisam necessariamente passar por processo de purificação para que seja

observada a floculação. Ficou determinado que tanto a antitoxina quanto o toxóide podem ser incubados em tubo de ensaio de vidro novos e sem riscos. Apenas para se ter maior segurança na leitura de materiais mal colhidos, o soro deve ser passado em filtro Millipore, antes de usado na técnica de floculação, uma vez que a turvação e hemólise do soro podem mascarar os resultados.

O tempo de floculação do primeiro tubo variou entre as amostras analisadas, obtendo-se tempos de 80, 33, 41, 120 e 270 min, para as amostras dos lotes 375/07, 551/08, 532/08, 373/07 e 378/07, respectivamente. Assim como no trabalho realizado por Iwaki *et al.* (2007), os maiores tempos para o início da floculação ocorreram nas amostras com menores quantidades de toxóide, indicando serem as amostras menos concentradas. Dessa forma, amostra 378/07 demorou 4,5 horas para flocular o primeiro tubo, ao passo que a amostra 375/07 floculou o primeiro tubo em 1 hora e 20 min. No entanto, ocorreu que as amostras de lotes 532/08 e 551/08 apresentaram tempo de floculação inferiores à amostra mais concentrada lote 375/07. Esses resultados são superiores aos resultados obtidos por Orlans *et al.* (1960), sugerindo, que além da concentração do toxóide, o tempo de floculação reflete a qualidade imunogênica do mesmo, implicando em que o tempo de floculação, muito mais que a concentração, indica a qualidade do antígeno. Porém, é necessária formulação de vacinas com antígenos contendo diferentes tempos de floculação, para confirmar que o poder imunogênico dos antígenos está diretamente relacionado ao tempo de floculação da amostra de toxóide. Levine e Wyman (1965) avaliaram três métodos de floculação, para comparar a equivalência entre toxóide e antitoxina, obtida pelos métodos avaliados. Nos três métodos avaliados, verificou-se a variação no tempo de ocorrência da floculação, na medida em que se aproximava da equivalência ótima, ou seja, os tubos que primeiro floculavam eram aqueles onde existia a melhor equivalência toxina / antitoxina.

Diante do exposto, observa-se que a técnica limite de floculação é uma boa alternativa para substituir os métodos *in vivo* de controle de qualidade de vacinas, sendo de fácil execução, direto, rápido e econômico, o que faz com

que seja uma técnica muito conveniente para substituir a utilização de animais nas análises de controle de qualidade de vacinas (Spaun e Lyng, 1970), apesar de Iwaki *et al.* (2007) relatarem que as análises que envolvem leituras visuais são demasiadamente subjetivas, apresentando baixa reprodutibilidade, devido à grande variação de pessoa para pessoa. Esse relato não foi o caso neste trabalho, pois as análises foram realizadas três vezes, por três técnicos diferentes e os resultados obtidos foram todos iguais. A subjetividade das leituras pode ser reduzida, quando se utilizam técnicos devidamente treinados e capacitados.

Assim, a técnica limite de floculação apresentada neste trabalho permitiu incrementar estudos de um teste preciso e de pouca infra-estrutura laboratorial para o controle de qualidade de processos e de produtos das indústrias produtoras de vacinas.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no decorrer deste trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

- a técnica limite de floculação não é eficiente para avaliar baixos títulos de antitoxina epsilon em soros de coelhos e carneiros imunizados com vacinas clostridiais. Assim, a referida técnica é inviável para substituir a soroneutralização em camundongo, utilizada para mensurar potência de vacinas contra clostridioses;
- a técnica limite de floculação apresenta linearidade frente a diluições seriadas de toxóides;
- a metodologia *in vivo*, TCP, para o controle de qualidade de toxóide destinado à produção de vacinas veterinárias pode ser substituída pela metodologia limite de floculação avaliada neste trabalho;
- o tempo de floculação remete não apenas à concentração do antígeno, mas à qualidade do mesmo;
- é necessária a validação da técnica *in vitro*, Limite de floculação, apresentada neste trabalho, para que possa substituir a metodologia *in vivo* de análise de toxóide epsilon.

5 REFERÊNCIAS

BRANDI, V. B. **Desenvolvimento e análises de validação de metodologias para o controle de processo de purificação e fabricação de vacinas contra Clostridium perfringens tipo D.** 2007. 160 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

EL IDRISSEI, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 389-396, June. 1992b.

IWAKI, M.; HORIUCHI, Y.; KOMIYA, T.; FUKUDA, T.; ARAKAWA, Y.; TAKAHASHI, M. Toxoid Flocculation Assay by Laser Light-Scattering. **Journal of Immunological Methods**, v. 10, n. 318, p. 138-146, Jan. 2007.

LEVINE, L.; WYMAN, L. The Flocculation Test and the Law of Mass Action. **The Journal of Immunology**, v. 94, n. 4, p. 586-591, Apr. 1965.

ORLANS, E. S.; RICHARDS, C. B.; JONES, V. E. Clostridium welchii epsilon-toxin and antitoxin. **Immunology**, v. 3, p. 28-44, Jan. 1960.

RAMON, G. A. propos du titrage in vitro du sérum antidiphtérique par la flocculation. **Compt Rend Soc Biol**, v. 86, p. 813-815, Oct. 1922.

SPAUN, J.; LYNG, J. Replacement of the international Standard for Tetanus Antitoxin and the use of Standard in the Flocculation Test. Bull. **Organisation Mondiale de La Santé**, v. 42, n. 4, p. 523-534, Apr. 1970.

WEISS, H. E.; WEISS, H. Nachweiss von Clostridium botulinum-Toxin mittels Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion. **Tierärztl.** v. 43, p. 117-126, Mar. 1988.