

Catarina Guimarães Rocha Dourado Lima

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE POTÊNCIA DE TOXÓIDE ALFA DE
Clostridium novyi TIPO B EM LINHAGEM CONTÍNUA DE CÉLULA**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2009

L732p Lima, Catarina Guimarães Rocha Dourado, 1979-
Padronização do teste de potência de toxóide alfa de *Clostridium novyi*
tipo B em linhagem contínua de célula / Catarina Guimarães Rocha Dourado
Lima. -2009.
28 p. :il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. *Clostridium* – Teses. 2. Clostridiose – Vacinas – Teses. 3. Vacina
Veterinária – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.931

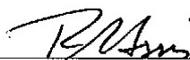
Dissertação defendida e aprovada em 13 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
(orientador)



Prof.^a Zélia Inês Portela Lobato



Dr. Ronnie Antunes de Assis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Edigar Dourado Lima e Maria das Graças Guimarães Rocha Dourado Lima, a minhas irmãs Tatiana e Kadja, e a meu namorado Ricardo Gomes, que me apoiaram nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edigar e Maria das Graças, pelo apoio e incentivo nessa busca por uma realização profissional e pessoal.

A minhas irmãs e melhores amigas, Tatiana e Kadja, que apesar da distância estiveram sempre presentes na minha vida.

Ao meu namorado Ricardo que soube compreender a minha ausência e respondeu com amor.

Ao meu orientar Francisco Lobato, pelo tempo dedicado e pelas palavras sábias.

A professora Zélia Lobato e Dr. Ronnie Assis pela imensa ajuda na execução do experimento.

Ao colega e amigo Felipe Salvarani que tanto contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

As inesquecíveis amigas Aline, Joana e Cíntia, fundamentais nessa trajetória.

Ao meu amigo Moisés, que dividiu comigo tristezas e alegrias.

Aos colegas de laboratório Phryscilla e Rodrigo pelos momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Grazi, Eduardo, Doracy e Fábía, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. LITERATURA CONSULTADA	11
2.1. Clostridium novyi.....	11
2.1.1. Clostridium novyi tipo B	11
2.1.1.1. Toxina alfa	11
2.1.1.2. Hepatite necrótica.....	12
2.1.1.3. Controle e profilaxia.....	12
2.2. Vacinas clostridiais	12
2.2.1. Controle da eficiência de vacinas clostridiais.....	13
2.2.2. Métodos alternativos para teste de potência de toxóides clostridiais	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Local de realização do experimento	16
3.2. Animais utilizados	16
3.3. Soro padrão	16
3.4. Cultura de célula	16
3.4.1. Linhagem celular	16
3.4.2. Meios, soluções e reagentes.....	16
3.5. Toxina alfa de Clostridium novyi tipo B.....	16
3.5.1. Amostra de Clostridium novyi tipo B	16
3.5.2. Meios de cultura para crescimento bacteriano	16
3.5.3. Cultivo da amostra	17
3.5.4. Produção da toxina alfa	17
3.5.5. Concentração da toxina alfa	17
3.6. Titulação da toxina alfa de Clostridium novyi tipo B	17
3.6.1. Titulação da toxina alfa em camundongos	17
3.6.2. Titulação da toxina alfa em cultivo celular	17
3.7. Padronização da toxina alfa de Clostridium novyi tipo B.....	17
3.7.1. Padronização da toxina alfa em camundongos.....	17
3.7.2. Padronização da toxina alfa em cultivo celular.....	18
3.8. Teste de potência de toxóide alfa de Clostridium novyi tipo B	18
3.8.1. Soros teste	18
3.8.1.1. Soros de ovinos e caprinos.....	18
3.8.1.1.1. Esquema de imunização.....	18
3.8.1.1.2. Obtenção dos soros	18
3.8.1.2. Soros dos coelhos	19
3.8.2. Titulação de anticorpos contra toxina alfa de Clostridium novyi tipo B pelo teste de soroneutralização em camundongos.....	19
3.8.3. Titulação de anticorpos contra toxina alfa de Clostridium novyi tipo B pelo teste de soroneutralização em cultivo celular.....	19
3.9. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Títulos da toxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em camundongos e em cultura de célula VERO.....	21
Tabela 2: Padronização da toxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em camundongos e em cultura de célula VERO.....	22
Tabela 3: Títulos de anticorpos neutralizantes contra toxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em animais imunizados com toxóide alfa determinados pelo teste de soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma com destaque para as principais etapas desenvolvidas na execução do experimento.....	15
Figura 2: Morfologia da monocamada da linhagem celular VERO. 2A: Célula VERO: monocamada íntegra (controle de célula). 2B: Célula VERO na presença da toxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B, apresentando retração e arredondamento celular.....	20
Figura 3: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos antitoxina alfa de <i>Clostridium novyi</i> tipo B em soros de animais analisados pela soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO, $r=0,9838$	24

RESUMO

Clostridium novyi tipo B é o patógeno responsável pela hepatite necrótica, causada pela ação da toxina alfa. O controle desta enfermidade é baseado na imunização dos animais com vacinas que contenham em sua composição toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, sendo o teste de potência deste realizado a partir de soros de coelhos imunizados, por meio da técnica de soroneutralização em camundongos. Este trabalho teve como objetivo padronizar um teste de potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B em linhagem de célula VERO, como método alternativo ao bioensaio animal. Os títulos de anticorpos neutralizantes contra a toxina alfa em cultura de célula VERO foram comparados com os resultados obtidos pela técnica em camundongos, sendo possível afirmar não haver diferença significativa entre os modelos testados. O coeficiente de correlação estabelecido entre os títulos obtidos pelas técnicas "in vitro" e "in vivo" foi de 98,38%, indicando ser possível a utilização do modelo estudado na substituição do modelo animal para teste de potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B.

Palavras-chave: *Clostridium novyi* tipo B, soroneutralização, vacinas, bioética.

ABSTRACT

Clostridium novyi type B is the pathogen responsible for necrotic hepatitis caused by the action of alpha toxin. The control of this disease is based on immunization of animals with vaccines containing in its composition alpha toxoid of *C. novyi* type B, and the potency test performed from sera of rabbits immunized by the technique of neutralization in mice. This study aimed to standardize a potency test of alpha toxoid of *C. novyi* type B in VERO cell line, as an alternative to animal bioassay. The neutralizing antibodies against alpha toxin in Vero cell culture were compared with results obtained by the technique in mice, and can claim no significant difference between the models. The correlation coefficient established between the titers obtained by the in vitro and in vivo tests was 98.38%, indicating a possible use of the model studied in the replacement of animal model for potency test of alpha toxoid of *C. novyi* type B.

Keywords: *Clostridium novyi* type B, serum neutralization, vaccines, bioethics.

1. INTRODUÇÃO

Clostridiose é a denominação de um grupo de infecções e intoxicações que acometem homem e animais, causada por bactérias do gênero *Clostridium*. Estes microrganismos passam por uma forma de resistência, chamada esporo, quando expostos a condições adversas, permanecendo viáveis no trato intestinal, em solos, pastagens, água doce ou salgada, alimentos de origem vegetal ou animal.

Clostridium novyi tipo B é o agente etiológico da hepatite necrótica. Esta enfermidade está geralmente associada à morte súbita, principalmente de ovinos, podendo ocorrer em outras espécies. Fatores predisponentes, como a presença de trematódeos hepáticos ou agentes que causam lesões hepáticas, resultam em condições favoráveis à multiplicação bacteriana, com conseqüente produção da toxina alfa, responsável pelo quadro patológico.

Embora se desconheça os prejuízos econômicos causados pela hepatite necrótica por falta de dados epidemiológicos, medidas de controle e profilaxia devem ser implantadas, principalmente com a imunização dos animais com vacinas que contenham toxóide alfa de *C. novyi*.

No Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan, 2008) existe, atualmente, o registro junto ao MAPA de 23 vacinas clostridiais polivalentes contendo toxóide alfa de *C. novyi*, que são comercializadas em território nacional.

A cada ano são produzidas em torno de 148 milhões de doses de vacinas clostridiais no país (Salvarani, 2007). Entretanto, apenas os antígenos de *C. chauvoei* e *C. botulinum*, presentes nas vacinas, são submetidas ao controle de qualidade oficial, de acordo com as normas definidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 1997), e o controle oficial da eficiência dos toxóides beta e épsilon de *C.*

perfringens tipos C e D está previsto para o primeiro semestre de 2009 (Ronnie Antunes de Assis, comunicação pessoal)⁽¹⁾.

A técnica “padrão ouro” utilizada na realização do teste de potência de toxóides clostridiais é a soroneutralização em camundongos, para quantificação de anticorpos neutralizantes, no soro de coelhos imunizados, contra os componentes da vacina (British Pharmacopoeia, 1998; EUA, 2008). Esta técnica exige a utilização de grande quantidade de animais de laboratório, além de gerar dor e sofrimento a estes animais. Fato que tem gerado interesse pelo desenvolvimento de métodos alternativos que reduzam ou até mesmo substituam o uso de animais de laboratório.

A utilização do ELISA para mensurar a resposta de anticorpos contra toxóide de *C. tetani* é uma técnica sorológica já validada para o teste de potência de vacinas veterinárias contra o tétano (Hendriksen et al., 1994). O uso de cultura celular como modelo indicador da presença de toxina livre no teste de soroneutralização para teste de potência de toxóides clostridiais pode ser um método alternativo viável e eficiente na substituição ao bioensaio animal, apresentando vantagens como redução de variação de resultados do teste, devido às diferenças individuais dos animais utilizados e redução dos custos com o teste (Metz et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo padronizar um teste de soroneutralização “in vitro”, utilizando como sistema indicador a linhagem celular VERO, para avaliar a potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B pela titulação de anticorpos neutralizantes em soros de animais imunizados com vacinas polivalentes clostridiais, como uma possível alternativa ao bioensaio em camundongos.

⁽¹⁾ Ronnie Antunes Assis. Comunicação pessoal 2008. (Laboratório nacional Agropecuário), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. *C. novyi*

C. novyi, anteriormente denominado *C. oedematiens*, foi descrito pela primeira vez em 1894. É um bacilo anaeróbico, Gram positivo em culturas jovens, podendo apresentar-se como Gram negativo em culturas velhas. É móvel, fermenta glicose, liquefaz gelatina, sua ação proteolítica é variável e é indol positivo. Este patógeno é extremamente sensível ao oxigênio, morrendo rapidamente quando exposto ao ar. Meios utilizados para seu cultivo devem ser pré-reduzidos e incubados sob condições estritas de anaerobiose (Hatheway, 1990).

C. novyi é classificado em quatro tipos, A, B, C e D de acordo com a produção de toxinas. O tipo A é o agente da gangrena gasosa em humanos e animais domésticos e produz apenas a toxina alfa. O tipo B produz além da toxina alfa, a toxina beta. O tipo C não produz nenhuma das duas toxinas citadas anteriormente, sendo considerado não patogênico. *C. novyi* tipo D, hoje denominado *C. haemolyticum*, causa a hemoglobinúria em bovinos (Hatheway, 1990; Songer, 1998).

2.1.1. *C. novyi* tipo B

2.1.1.1. Toxina alfa

Dentre as toxinas produzidas pelo *C. novyi* tipo B, a toxina alfa se destaca por ser a responsável pelo quadro observado na hepatite necrótica. Esta tem ação necrotizante, letal e causa aumento da permeabilidade vascular (Hatheway, 1990).

Bette et al. (1989) estudaram a ação da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em cultura de célula, com o objetivo de comparar os efeitos da toxina "in vitro" e "in vivo". Achados de necropsia em camundongos inoculados com toxina alfa pela via intravenosa incluíram extravasamento de líquido no tecido intersticial, na cavidade abdominal e pleural, sem sinais de hemorragia. Cultura de célula, preparada a

partir de artéria pulmonar de suíno, perdeu sua estrutura original após exposição à toxina alfa. O efeito citopático se iniciou com a formação de aberturas irregulares entre as células endoteliais, que permaneceram ligadas, umas as outras, por filamentos delgados, caracterizando retração celular. Em seguida, as células se tornaram arredondadas, sugerindo que a toxina alfa induz a contração celular, possivelmente pelo rearranjo do citoesqueleto. Além disso, a vasoconstrição venosa pode aumentar a pressão intravenosa e aumentar os poros entre células endoteliais intactas.

Muller et al. (1992) e Oksche et al. (1992) analisaram as alterações morfológicas causadas pela toxina alfa de *C. novyi* após microinjeção intracelular e aplicação extracelular, respectivamente, em cultura de células endotelial de artéria pulmonar de suínos. Ambos os trabalhos demonstraram a predominante ação da toxina alfa no citoesqueleto, principalmente, sobre os filamentos de actina. Porém, sem definir o modo de ação primário da toxina alfa.

A toxina alfa, assim como as toxinas A e B produzidas pelo *C. difficile* e as toxinas HT (toxina hemorrágica) e LT (toxina letal), produzidas pelo *C. sordellii*, faz parte do grupo das grandes toxinas clostridiais, apresentando peso molecular superior a 200 kDa. A ação desta classe de toxinas resulta no arredondamento celular em cultura de células, sugerindo efeito no citoesqueleto de células de mamíferos (Ball et al., 1993).

Titball et al. (2006) descrevem a toxina alfa de *C. novyi* como uma glicosil-transferase. A toxina alfa cataliza a glicosilação de proteínas G, utilizando como cosubstrato a UDP-N-acetilglicosamina, transferindo a N-acetilglicosamina para o aminoácido receptor treonina de proteínas do grupo Rho. A inibição das proteínas Rho pela ação da toxina alfa desorganiza os filamentos de actina, resultando em efeitos como arredondamento celular, perda das junções intercelulares e aumento da permeabilidade epitelial e endotelial.

2.1.1.2. Hepatite necrótica

C. novyi tipo B é o agente responsável pela hepatite necrótica, também conhecida como moléstia negra, que acomete principalmente ovinos, podendo ocasionalmente acometer bovinos, eqüinos e suínos (Sterne e Batty, 1975; Radostits et al., 2002).

C. novyi tipo B pode ser isolado do fígado de grande parte de ovinos sadios. A hepatite necrótica pode desenvolver nestes animais quando ocorre migração da larva de *Fasciola hepática*, provocando lesões focais no fígado, nas quais *C. novyi* tipo B encontra condições favoráveis para multiplicar-se, produzindo a toxina alfa, resultando em áreas de necrose características da enfermidade. Além dessa lesão, a bactéria se dissemina causando uma intensa bacteremia e toxemia (Sterne e Batty, 1975).

Myiashiro et al. (2006) relataram a ocorrência de hepatite necrótica por meio da detecção do DNA de *C. novyi* tipo B no fígado de uma novilha em uma propriedade de criação extensiva no Estado de Santa Catarina, Brasil, na qual foi relatada alta infestação por *Fasciola hepática*, o que poderia ser o fator desencadeante desta clostridiose.

O uso de quimioterápicos também pode ocasionar a hepatite necrótica, como relatado por Uzal et al. (1996), na Argentina, que diagnosticaram esta enfermidade em quatro ovinos pela técnica de imunofluorescência direta.

Robles et al. (2000), na Argentina, relataram um surto de hepatite infecciosa necrótica, com identificação de *C. novyi* tipo B pela técnica de imunofluorescência direta com morte de 80 ovelhas em um rebanho com 1200 animais que apresentavam um severo parasitismo por *Thrypanosoma actinioides*, como provável fator desencadeante da hepatite necrótica.

A morte dos ovinos por hepatite necrótica ocorre rapidamente e normalmente sem apresentação de sintomas. Porém, quando

ocorrem, observa-se relutância em mover-se, apatia, respiração rápida e superficial, vindo a óbito em poucas horas (Radostits et al., 2002).

A decomposição após a morte ocorre rapidamente. A denominação moléstia negra ocorre em função do aspecto escuro da parte interna da pele, causada por uma congestão venosa subcutânea. A lesão típica ocorre no fígado e está sempre presente, evidenciando-se na superfície capsular, especialmente na superfície diafragmática, podendo-se observar áreas branco-amareladas de necrose, rodeadas por uma ampla zona de intensa hiperemia. Normalmente, também, são observadas lesões agudas ou crônicas de parasitos migratórios (Kelly, 1993).

2.1.1.3. Controle e profilaxia

Devido às características ecológicas do agente, por estar presente no solo e ser habitante do trato intestinal de animais e homens sadios, sua erradicação é praticamente impossível. Portanto, o controle da enfermidade baseia-se, principalmente, em medidas preventivas de manejo e vacinação sistemática de todo rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que podem desencadear a doença (Lobato e Assis, 2000).

2.2. Vacinas clostridiais

As vacinas clostridias disponíveis no mercado brasileiro na sua grande maioria são polivalentes, compostas por múltiplos antígenos, toxóides e/ou bacterinas, e são usadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes ou produtos tóxicos que podem participar das enfermidades. A eficiência destas vacinas está relacionada à natureza dos antígenos que as compõem. Quando bem elaboradas, são altamente antigênicas, oferecendo boa proteção aos animais (Assis et al., 2001).

2.2.1. Controle da eficiência de vacinas clostridiais

No país, diversos trabalhos foram relatados com o intuito de se avaliar a eficiência das vacinas clostridiais.

Azevedo et al. (1998) avaliaram a eficiência de sete vacinas que continham toxóides de *C. perfringens* tipos C e/ou D, pelo teste de soroneutralização em camundongos a partir do “pool” de soros de coelhos imunizados. Seis vacinas produzidas no Brasil foram ineficientes em estimular níveis sorológicos de antitoxinas beta e epsilon compatíveis com os níveis recomendados para controle destes produtos. Somente uma vacina importada apresentou títulos de anticorpos séricos superiores aos níveis mínimos exigidos.

Lobato et al. (2000) avaliaram a resposta de antitoxinas beta e epsilon de *C. perfringens* em bovinos vacinados contra clostridioses com seis vacinas disponíveis no mercado e um toxóide padrão, constatando que apenas duas vacinas e o toxóide padrão atenderam os requisitos mínimos exigidos pelo teste de potência em coelhos e induziram a produção de anticorpos neutralizantes nos bovinos vacinados.

Nascimento (2003) avaliou a eficiência de 13 vacinas comerciais contra clostridiose que continham em sua composição antígenos de *C. novyi* tipo B, pela titulação de antitoxina alfa em soros de coelhos e de bovinos vacinados e pelo teste de desafio direto em cobaias com suspensão de esporos. Constatou que apenas duas vacinas induziram níveis de anticorpos em coelhos e bovinos compatíveis com o nível mínimo exigido pela legislação brasileira. Pelo método de desafio direto em cobaias, cinco vacinas atenderam aos requisitos, protegendo os animais desafiados.

O Manual de “Standards for Diagnostic Test and Vaccines” (OIE, 2008) apresenta os princípios para produção de vacinas veterinárias, com recomendações para a utilização da “European Pharmacopoeia”, que determina os mesmos procedimentos que a “British Pharmacopoeia”, e “Code of

Federal Regulations” (CFR / EUA), como referências para os testes de potência para avaliação da qualidade de vacinas clostridiais.

No Brasil, a produção, controle da qualidade e eficiência das vacinas contra clostridioses são definidas pela Portaria número 49 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 1997), que recomenda que o teste de potência para toxóide alfa de *C. novyi* tipo B seja realizado conforme recomendações da “British Pharmacopoeia” (1998), a qual exige que o título dos soros seja igual ou superior a 3,5UI/ml. Diferentemente, o CFR (EUA, 2008) determina, para o teste de potência do toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, título de soro igual ou superior a 0,5UI/ml.

A técnica oficialmente empregada para a realização do teste de potência para toxóides clostridiais é a soroneutralização em camundongos pela titulação dos soros de coelhos vacinados (British Pharmacopoeia, 1998). Embora o teste de soroneutralização em camundongo seja reconhecido pela sensibilidade e segurança, este é um teste demorado, apresenta alguns resultados imprecisos devido a variações de sensibilidade individual dos animais, é relativamente caro (Wood, 1991), além de causar dor e sofrimento e requerer o uso de grande número de animais (Ebert et al., 1999).

2.2.2. Métodos alternativos para teste de potência de toxóides clostridiais

Nos últimos anos, esforços têm sido feitos para reduzir o número de experimentos com animais nos testes de potência de toxóides clostridiais, com o desenvolvimento de diversas pesquisas com intuito de validar métodos alternativos para o controle de qualidade de vacinas clostridiais (Cussler et al. 2002).

Wood (1991) padronizou um ELISA indireto como método alternativo ao teste de soroneutralização em camundongos para determinação dos níveis de anticorpos contra as toxinas de *C. tetani*, *C. septicum*, *C. novyi* tipo B e toxina epsilon de *C.*

perfringens tipo D, utilizando como padrão, soros previamente avaliados pela soroneutralização em camundongos. O coeficiente de correlação entre os títulos obtidos na soroneutralização e no ELISA foi de 0,94 para *C. septicum*, 0,93 para *C. tetani*, 0,84 para *C. novyi* tipo B e 0,93 para toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Uzal et al. (1997) demonstraram que o ELISA indireto e competitivo é um técnica rápida, simples, sensível e específica na detecção de anticorpos para toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D em soro de caprinos, obtendo um coeficiente de correlação entre o ELISA indireto e a soroneutralização em camundongos de 0,99, enquanto que para o ELISA competitivo foi de 0,98.

Cultura de célula pode ser utilizada como indicador eficiente de toxina livre nos testes de neutralização de toxinas, embora este tipo de ensaio seja restrito às toxinas que causam efeito citopático em linhagens de célula, como filtrados de cultura de *C. septicum*, *C. perfringens* e *C. novyi*, que são letais para determinadas culturas de célula (Knight et al., 1990a).

Knight et al. (1990a) padronizaram um teste de soroneutralização em cultura de célula para detecção de antitoxina alfa de *C. septicum*, utilizando a linhagem celular "African Green Kidney Monkey" (VERO). O título da toxina alfa produzida foi de 1.170 DMM/ml (dose mínima mortal) em camundongo e de 738.000 ECP/ml (efeito citopático) em cultura de célula. Na padronização da toxina em camundongo o nível de teste utilizado foi L+/5 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,2UI de antitoxina padrão homóloga resulta na morte dos camundongos inoculados em até 72 horas) e para a padronização em cultura de célula foi de L+/25 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,04UI de antitoxina padrão homóloga resulta em 90% de efeito citopático), obtendo títulos de 115L+/5/ml e 4.720L+/25/ml, respectivamente. A correlação estabelecida entre a soroneutralização em camundongo e em cultura de célula foi de 91%.

Souza Júnior (2005) padronizou um teste de soroneutralização em cultura de célula para titulação de antitoxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, utilizando a linhagem celular "Madin Darby Canine Cells" (MDCK), estabelecendo uma correlação de 99,73% entre os resultados obtidos nos testes "in vivo" e "in vitro".

Salvarani (2007) padronizou um teste de neutralização em cultura de célula, para avaliação da potência do toxóide alfa de *C. septicum*, utilizando a linhagem celular VERO. O título da toxina alfa em camundongo foi de 2.920 DMM/ml e em cultura de célula foi de 2.621.440 ECP/ml. Na padronização da toxina alfa em camundongo foi empregado o nível de teste L+/5, e na padronização na cultura de célula foi L+/25, obtendo títulos de 200L+/5/ml e 5.120L+/25/ml, respectivamente. A correlação entre os títulos obtidos pela soroneutralização em camundongo e em cultura de célula foi de 99,12%.

Borrmann e Schulze (1999) avaliaram a sensibilidade de dez linhagens de célula frente à toxina alfa de *C. novyi* tipo B. A linhagem celular "Embryonal Skin Cells of Sheep" (ESH-L) foi a mais sensível à ação da toxina alfa. As células VERO e "Thymus Cells of Sheep" (SFT-R) demonstraram alta sensibilidade, porém foram menos sensíveis que a ESH-L à toxina alfa.

Borrmann et al. (2006) desenvolveram um ensaio em cultura de célula para determinar o título de anticorpos contra toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D e toxina alfa de *C. novyi* tipo B em soros de coelhos vacinados, utilizando as linhagens de célula MDCK e VERO, respectivamente. Grupos de coelhos foram vacinados com diferentes vacinas (A, B, C e D) e foram titulados individualmente. Os coeficientes de correlação, entre a soroneutralização em camundongo e em cultura de célula, determinados para os soros titulados frente à toxina épsilon, foram para os soros A de 60% e para os soros B de 72%. Nos soros titulados frente à toxina alfa de *C. novyi* tipo B, os coeficientes de correlação estabelecidos entre o ensaio em cultura de célula e o bioensaio animal foram de 80% para os soros A e 90% para os

soros D. O coeficiente de 89% para os soros C foi determinado entre o ensaio em cultivo de célula e um ELISA.

Embora diversos estudos tenham sido feitos a respeito de métodos alternativos à soroneutralização em camundongos para o teste de potência de toxóides clostridiais, estes devem ser submetidos ao processo de validação para que possam ser utilizados oficialmente no controle de qualidade de vacinas clostridiais. Apenas o teste de ELISA, para mensurar a resposta de

anticorpos contra toxóide tetânico, foi validado e está sendo empregado para o teste de potência de vacinas veterinárias contendo em sua composição toxóide tetânico (Hendriksen et al., 1994, EUA, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma com destaque para as principais etapas desenvolvidas na execução do experimento é apresentado na Figura 1.

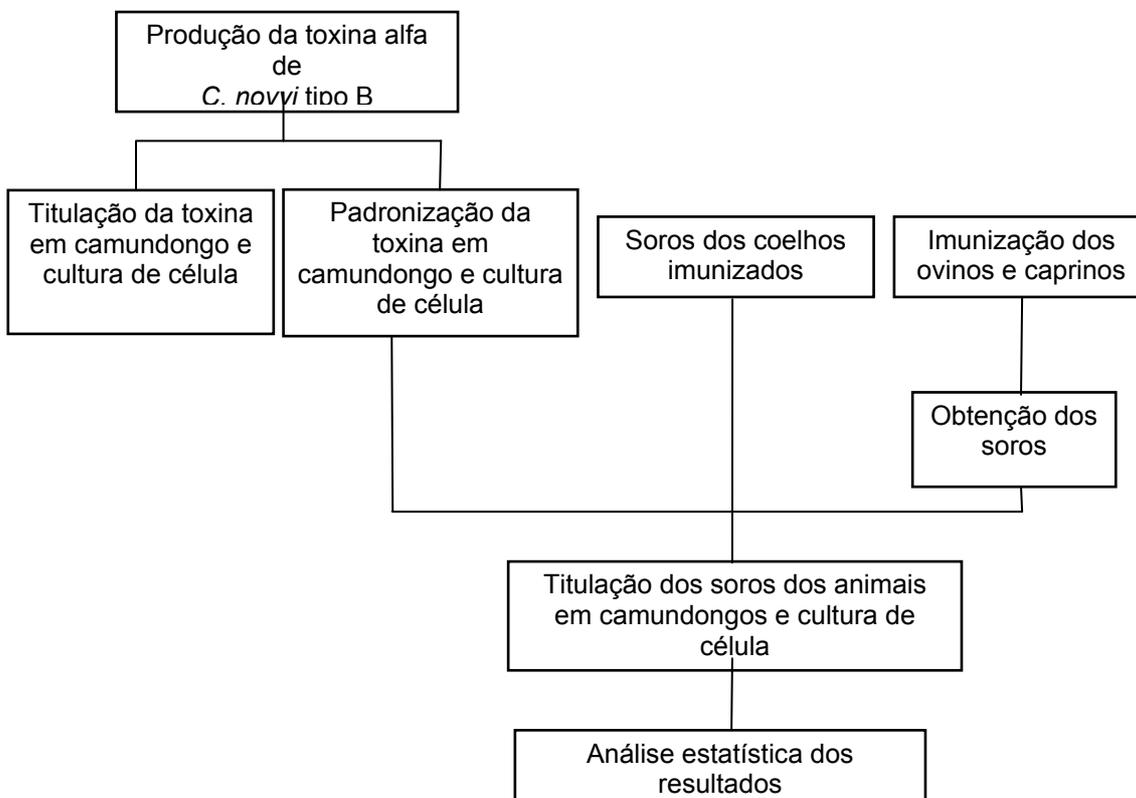


Figura 1: Fluxograma com destaque para as principais etapas desenvolvidas na execução do experimento.

3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG).

3.2. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, com peso entre 16 e 20g, de ambos os sexos, cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, seis ovinos da raça Santa Inês, e seis caprinos da raça Pardo Alpino, de ambos os sexos, com idade variando entre quatro e oito meses.

3.3. Soro padrão

Antitoxina alfa de *C. novyi* (Gas Gangrene Antitoxin, Code No: 64/024), produzida em equino, contendo 1100 UI/ampola, foi adquirida junto ao “National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC, Inglaterra).

A resuspensão do material liofilizado foi feita utilizando-se 1,0ml de água destilada estéril, conforme recomendação do fabricante. Diluições subseqüentes foram realizadas para obtenção de soluções contendo 10UI/ml e 8UI/ml para a padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B e controle positivo do teste de soroneutralização em camundongos e em cultivo celular, respectivamente.

3.4. Cultura de célula

3.4.1. Linhagem celular

A linhagem contínua de célula utilizada foi a “African Green Kidney Monkey” (VERO, ATCC – “American Type Culture Collection”- N° CCL-81), cedida pelo Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de

Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

3.4.2. Meios, soluções e reagentes

Meio essencial mínimo⁽¹⁾ (MEM) foi utilizado para cultivo da célula VERO. A suplementação do meio foi feita com 5% (v/v) de soro fetal bovino⁽²⁾ (SFB) e 2mM de glutamina, 2UI/ml de penicilina, 2µg/ml de estreptomicina e 0,0125µg de fungizon.

A linhagem celular foi cultivada em frascos de 150cm³ até a confluência mínima de 90%, em estufa úmida, com atmosfera controlada de 5% de CO₂ a 37°C. Solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 (NaCl 8,0g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄H₂O 1,3g; KHPO₄ 0,2g; H₂O Milli-Q qsq 1000mL) e solução de tripsina/versene⁽²⁾ (STV) foram utilizadas para lavagem da monocamada celular e obtenção da suspensão de células, respectivamente.

3.5. Toxina alfa de *C. novyi* tipo B

3.5.1. Amostra de *C. novyi* tipo B

Foi utilizada uma amostra de referência de *C. novyi* tipo B (“Agriculture Animal Plant Health Inspection Service” – APHIS, EUA / IRP-307) cedida pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

3.5.2. Meios de cultura para crescimento bacteriano

Foi utilizado o meio de cultura Reinforced Clostridial Medium (RCM)⁽¹⁾ e, para produção da toxina alfa, o meio descrito por Cardella (1958) modificado pela adição de cloreto de sódio, sulfato de magnésio e L-cisteína.

⁽¹⁾ Gibco Laboratories, USA.

⁽²⁾ Difco Laboratories, USA.

⁽¹⁾ Difco Laboratories, USA.

3.5.3. Cultivo da amostra

A amostra de *C. novyi* tipo B foi semeada em caldo RCM e incubada a 37°C em câmara de anaerobiose por um período de 24 horas.

3.5.4. Produção da toxina alfa

Foi adicionado um inóculo de 10% (v/v) de cultura de *C. novyi* tipo B em Meio Cardella (1958) modificado pela adição de cloreto de sódio, sulfato de magnésio e L-cisteína, e incubado a 37°C em câmara de anaerobiose por 24 hora. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 8000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante submetido ao processo de concentração.

3.5.5. Concentração da toxina alfa

O sobrenadante da cultura de *C. novyi* tipo B foi concentrado dez vezes por sistema de ultrafiltração tangencial com cartucho Pellicon⁽²⁾ de retenção de 10 kDa. A toxina foi armazenada a -80°C até sua utilização.

3.6. Titulação da toxina alfa de *C. novyi* tipo B

3.6.1. Titulação da toxina alfa em camundongos

Foram realizadas diluições seriadas, com fator de diluição de 1,2, a partir da toxina na diluição 1:100 até a diluição de 1: 2.218,61, em solução salina peptonada a 1%, para determinação da DMM/ml (dose mínima mortal / ml). Para cada diluição foram inoculados dois camundongos com 0,2ml, por via intravenosa. Os camundongos foram observados por 72 horas (British Pharmacopoeia, 1998).

3.6.2. Titulação da toxina alfa em cultivo celular

Foram realizadas diluições seriadas da toxina, com fator de diluição de 1,2, com quatro repetições para cada diluição, em

placas de 96 poços⁽¹⁾. Nos primeiros quatro poços aplicou-se 100µl da toxina pura, e nos demais foram aplicados 50µl de MEM suplementado. Realizou-se a diluição seriada, e em seguida, adicionou-se em cada poço 50µl de MEM e 50µl da suspensão de células. Como controle positivo e negativo, utilizou-se 50µl de toxina alfa pura, 50µl de MEM e 50µl da suspensão de células, e 100µl de MEM e 50µl da suspensão de células, respectivamente.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa controlada com 5% de CO₂ e 95% de O₂. O sobrenadante foi descartado e as placas foram coradas com 100µl/poço com solução de cristal violeta a 1% (v/v) durante dez minutos. O corante foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com 100µl de solução de PBS pH 7,2 (Souza Júnior, 2005). O título da toxina alfa foi determinado pela visualização do efeito citopático, por meio da determinação da porcentagem de confluência da monocamada celular.

Foram testadas duas concentrações de célula por poço, contendo $1,0 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ células em 50µl, e avaliado o tempo de incubação das placas, realizando-se a leitura após 48 e 72 horas, a fim de determinar qual a quantidade de células por poço e o tempo de incubação resultaria em confluência da monocamada celular em torno de 90% para que fosse possível a realização da leitura das placas.

3.7. Padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B

3.7.1. Padronização da toxina alfa em camundongos

A padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos foi realizada utilizando-se o nível de teste L+/100 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,01UI de antitoxina padrão homóloga é capaz de matar 80% dos camundongos inoculados em até 72 horas), conforme

⁽²⁾ Millipore Corporation, USA

⁽¹⁾ Sarstedt, USA.

preconizado pelo “Code Federal Regulations”, CFR (EUA, 2008).

A padronização foi realizada pelo teste de soroneutralização, que consistiu na diluição seriada da toxina alfa na diluição 1:2 até 1:64, em solução salina peptonada a 1%, utilizando-se fator de diluição de 1,2 entre as diluições para a determinação do “end point”. Cada diluição da toxina foi misturada a antitoxina alfa padrão na concentração de 0,1UI/ml. A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por uma hora, e em seguida, foram administrados 0,2ml em cinco camundongos por diluição, por via intravenosa. Os camundongos foram observados por 72 horas. O “end point” foi determinado na maior diluição da toxina que resultou em morte de 80% dos camundongos inoculados.

3.7.2. Padronização da toxina alfa em cultivo celular

A padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B na linhagem celular VERO foi realizada empregando-se diferentes níveis de teste: L+/10 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,1UI de antitoxina padrão homóloga resulta entre 80 e 90% de efeito citopático), L+/50 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,02UI de antitoxina padrão homóloga resulta entre 80 e 90% de efeito citopático), L+/100 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,01UI de antitoxina padrão homóloga resulta entre 80 e 90% de efeito citopático) e L+/200 (menor quantidade de toxina que quando misturada a 0,005UI de antitoxina padrão homóloga resulta entre 80 e 90% de efeito citopático).

A padronização foi realizada pelo teste de soroneutralização em placas de 96 poços, que consistiu na diluição seriada da toxina alfa de 1:2 até 1:64, em quadruplicata, com fator de 1,2 entre as diluições, resultando em um volume final de 50µl por poço. Foram adicionados 50µl de antitoxina alfa padrão em cada poço nas concentrações de 2UI/ml, 0,4UI/ml, 0,2UI/ml e 0,1UI/ml, de acordo com o nível de teste empregado. As placas foram homogeneizadas

manualmente por 30 segundos e incubadas a 37°C por uma hora em estufa úmida com 5% de CO₂. Após este período, foi adicionada a suspensão celular e as placas foram novamente incubadas, nas mesmas condições anteriores. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as placas coradas com 100µl/poço com solução de Cristal Violeta a 1% durante dez minutos. O corante foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com 100µl de solução de PBS pH 7,2 (Souza Júnior, 2005). O título da toxina alfa foi determinado na maior diluição da toxina que resultou em efeito citopático de 80-90% da monocamada celular.

Foram testadas duas concentrações de célula por poço, contendo $1,0 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ células em 50µl, e avaliado o tempo de incubação das placas, realizando-se a leitura após 48 e 72 horas, a fim de determinar qual a quantidade de células por poço e o tempo de incubação resultaria em confluência da monocamada celular em torno de 90% para que fosse possível a realização da leitura das placas.

3.8. Teste de potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B

3.8.1. Soros teste

3.8.1.1. Soros de ovinos e caprinos

3.8.1.1.1. Esquema de imunização

Os ovinos e caprinos foram imunizados com uma vacina comercial contendo toxóide alfa de *C. novyi* tipo B em sua composição. Foram administradas duas doses de 3,0ml da vacina, com intervalo entre elas de 42 dias, por via subcutânea, conforme recomendações do fabricante.

3.8.1.1.2. Obtenção dos soros

Os soros dos ovinos e caprinos foram obtidos 56 dias após a primeira dose da vacina. Os animais foram sangrados na veia jugular, e após centrifugação, o soro de cada animal foi estocado a -20°C, até o

momento da titulação de anticorpos neutralizantes contra toxina alfa.

3.8.1.2. Soros dos coelhos

Os soros dos coelhos utilizados nos testes de soroneutralização “in vivo” e “in vitro” pertencem ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG. Os coelhos foram imunizados com vacinas clostridiais, contendo toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, disponíveis no mercado brasileiro. Foram utilizadas dez vacinas, que foram codificadas de T1 a T10. As vacinas T1, T4 e T5 foram produzidas pelo mesmo laboratório, porém são de partidas diferentes. As vacinas T2, T6, T7 e T10 foram produzidas pelo mesmo laboratório, porém são de partidas diferentes. Assim como as vacinas T3, T8 e T9.

Para cada uma das vacinas, oito coelhos receberam duas doses da vacina, na menor dose recomendada pelo fabricante, com intervalo de 14 dias entre as doses. Após 21 dias da segunda dose da vacina, colheu-se sangue dos coelhos. Os soros dos oito animais de cada grupo foram misturados, em partes iguais, formando um “pool” (British Pharmacopoeia, 1998). Os soros permaneceram armazenados a -20°C até a utilização nos ensaios.

3.8.2. Titulação de anticorpos contra toxina alfa de *C. novyi* tipo B pelo teste de soroneutralização em camundongos

Os soros dos seis ovinos, seis caprinos e os dez “pools” dos coelhos foram titulados pelo teste de soroneutralização em camundongos contra a toxina alfa de *Clostridium novyi* tipo B previamente padronizada no nível de teste L+/100, segundo metodologia descrita no “Code Federal Regulations”, CFR (EUA, 2008).

Foram realizadas diluições seriadas dos soros teste, utilizando-se fator de diluição de 1,2 em salina peptonada a 1%, seguida pela adição da toxina padronizada. A mistura foi mantida a 37°C por uma hora. Para cada diluição dos soros foram inoculados cinco camundongos por via endovenosa com

0,2ml da mistura. Estes foram observados por 72 horas. Os títulos dos soros foram determinados na primeira diluição dos mesmos que resultou na morte de 80% dos camundongos inoculados. Como controle do teste, foi realizada a retrotitulação da toxina alfa utilizando-se antitoxina alfa padrão contendo 8,0UI/ml.

3.8.3. Titulação de anticorpos contra toxina alfa de *C. novyi* tipo B pelo teste de soroneutralização em cultivo celular

Foram realizadas diluições seriadas dos soros teste, utilizando-se fator de diluição 1,2, com quatro repetições para cada diluição, em placas de 96 poços, resultando em volume final de 50µl. Foram adicionados em cada poço 50µl da toxina padronizada no nível de teste L+/200. As placas foram homogeneizadas manualmente por 30 segundos e incubadas a 37°C por uma hora em estufa úmida com 5% de CO₂. Após este período, foi adicionada a suspensão celular contendo 2,5 x 10⁴ células em 50µl. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições anteriores, e a leitura realizada com 48 horas.

Para realização da leitura, o sobrenadante foi descartado e as placas foram coradas com 100µl/poço de solução de Cristal Violeta a 1% durante dez minutos. O corante foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com 100µl de solução de PBS pH 7,2 (Souza Júnior, 2005). Os títulos dos soros foram determinados na primeira diluição dos mesmos que resultou em efeito citopático em 80-90% da monocamada celular.

Como controle negativo utilizou-se 100µl de MEM e 50µl da suspensão celular. No controle dos soros, em cada poço foram adicionados 50µl do soro puro, 50µl de MEM e 50µl da suspensão celular. Como controle do teste, foi realizada a retrotitulação da toxina alfa utilizando-se antitoxina alfa padrão contendo 8,0UI/ml.

3.9. Análise estatística

Foi empregado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial com parcela subdividida, sendo a parcela a espécie animal e a subparcela o método aplicado. Para análise estatística dos resultados obtidos empregou-se o teste de Lilliefors para verificação de normalidade, testes de Cochran e Bartlett para verificação da homogeneidade de variâncias, o teste t de Student para comparação das médias dos tratamentos, e o quadrado de Pearson para estabelecer a correlação paramétrica entre os tratamentos aplicados (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito citopático causado pela toxina alfa de *C. novyi* tipo B na monocamada, quando

observado por microscopia, demonstrou arredondamento e destruição celular quando a cultura foi exposta a altas concentrações da toxina. Na maior diluição da toxina que resultou em efeito citopático de 80 a 90% das células pôde-se observar presença de células em processo de retração, juntamente com células arredondadas (Figura 2), como descrito por Borrmann e Schulze (1999). De acordo com Muller et al. (1992), Oksche et al. (1992) e Titball et al. (2006) estas alterações morfológicas ocorrem devido ao mecanismo de ação da toxina alfa sobre o citoesqueleto celular, desorganizando os filamentos de actina.

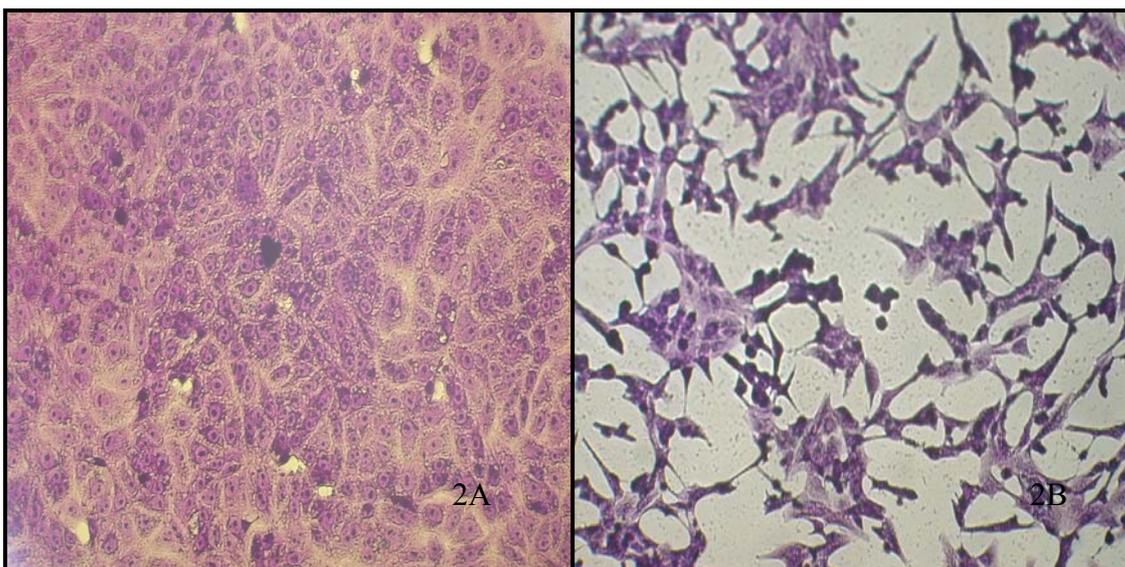


Figura 2: Morfologia da monocamada da linhagem celular VERO. 2A: Célula VERO: monocamada íntegra (controle de célula). 2B: Célula VERO na presença da toxina alfa de *C. novyi* tipo B, apresentando retração e arredondamento celular.

No momento da titulação e padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B na linhagem celular VERO, determinou-se parâmetros como concentração de célula por poço e tempo de incubação das placas. Foram utilizadas $2,5 \times 10^4$ células / poço e o tempo de incubação das placas adotado foi de 48 horas. Estes parâmetros diferem dos adotados por Borrmann e Schulze (1999)

que utilizaram $1,0 \times 10^4$ células por poço e incubaram as placas durante três dias. Porém, optou-se por utilizar uma maior concentração de células por poço, reduzindo o tempo de incubação para 48 horas, o que permitiu que em menor período de tempo obtivesse uma confluência celular em torno de 90%, podendo-se realizar a leitura mais rapidamente.

O título da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em cultura de célula VERO foi determinado pela maior diluição da toxina que resultou em efeito citopático de 80 a 90% da monocamada celular. Este parâmetro foi o mesmo adotado por Borrmann e Schulze (1999) para observação do efeito citopático da toxina alfa em célula VERO e de Borrmann et al. (2006) para observação do efeito citopático da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D em célula MDCK.

Optou-se por considerar efeito citopático de 80 a 90% na monocamada celular devido ao efeito da toxina alfa de *C. novyi* tipo B na célula VERO. Pois, esta em contato com baixas concentrações da toxina alfa, apresenta alterações morfológicas, sem que necessariamente ocorra morte celular, o que dificulta o estabelecimento do ponto de corte. Efeito semelhante ocorre com a célula MDCK na presença da toxina épsilon. A

ação desta toxina é baseada na ligação com receptores e formação de poros não seletivos na membrana, resultando em aumento da permeabilidade celular a íons (Petit et al., 2003), podendo-se observar células retraídas e arredondadas, ao lado de células intactas e lisadas como descrito por Borrmann et al. (2006).

Este parâmetro de avaliação difere do adotado por Salvarani (2007), que determinou o título da toxina onde se observava 100% de efeito citopático na monocamada. Isto se deve ao diferente modo de ação da toxina alfa de *C. septicum*, que forma poros na membrana celular, com conseqüente lise osmótica (Titball et al., 2006).

Os títulos da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos e em cultura de célula VERO são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Títulos da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos e em cultura de célula VERO.

Modelo experimental	Título
Camundongo	8.916,10 DMM/ml (dose mínima mortal/ml)
Cultura de célula VERO	30.814,04 ECP/ml (efeito citopático/ml)

O título da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos foi superior ao encontrado por outros autores, como Harbola e Verma (1988), Amimoto et al. (1998) e Nascimento (2003), que obtiveram títulos de 2.000 DMM/ml, 5.120 DMM/ml e 2.000 DMM/ml em camundongos, respectivamente.

Os diferentes títulos da toxina alfa obtidos nos trabalhos citados pode ser explicado pela utilização de diferentes amostras de *C. novyi* tipo B e por diferenças nas etapas do processo de produção da toxina.

Neste trabalho, para a produção da toxina, foi utilizado o meio descrito por Cardella (1958), mesmo usado por Nascimento (2003), com algumas modificações como adição de cloreto de sódio, sulfato de magnésio e L-cisteína. O que difere de Amimoto et al. (1998) que utilizou o caldo "Heart Infusion Broth" (BHI). O tempo de incubação da amostra de *C. novyi* tipo B foi

de 24 horas, superior às 18 horas de incubação realizada por Nascimento (2003) e inferior às 48 horas de incubação adotada por Harbola e Verma (1988).

O processo de concentração da toxina alfa foi realizado por sistema tangencial de ultrafiltração com cartucho Pellicon⁽¹⁾ de retenção de 10 kDa, de mesma porosidade da membrana utilizada por Nascimento (2003), embora o sistema utilizado por este autor tenha sido o vertical (Amicon)⁽¹⁾, e de porosidade diferente da utilizada por Amimoto et al. (1998) que foi de 50 kDa. Harbola e Verma (1988) não realizaram o processo de concentração por ultrafiltração e, mesmo assim, a toxina alfa apresentou título semelhante a da toxina produzida por Nascimento (2003).

⁽¹⁾ Millipore Corporation, USA

O filtrado da toxina, obtido após a ultrafiltração, não foi submetido ao processo de precipitação por sulfato de amônio como descrito por Nascimento (2003) ou purificação por cromatografia de troca iônica como descrita por Amimoto et al. (1998), porém resultou em uma toxina com título superior à obtida por estes autores.

O título da toxina alfa em célula VERO foi 3,45 vezes superior ao observado em camundongos, o que demonstra a maior sensibilidade do sistema célula em detectar menores concentrações de toxina alfa, como também foi relatado por Amimoto et al. (1998).

Neste trabalho, para realização da leitura, as placas foram coradas com cristal violeta 1%. Este mesmo corante foi utilizado por Souza Júnior (2005) e Salvarani (2007) na concentração de 0,1%. Este método de leitura difere do utilizado por Amimoto et al. (1998), Borrmann e Schulze (1999) e

Borrmann et al. (2006), que ao avaliarem o efeito de toxinas em cultura de célula, utilizaram o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) com leitura por densidade óptica em leitor de ELISA. Este corante, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, resultando em mudança de cor, refletindo o estado funcional da cadeia respiratória celular. Esta técnica demonstra ser precisa na determinação da viabilidade celular, pois identifica células metabolicamente ativas (Borrmann et al., 2006). Porém, optou-se pela utilização da coloração por cristal violeta por esta ser uma técnica prática e rápida, que permite uma leitura visual sem a necessidade do uso do microscópio ou leitor de ELISA.

Os resultados da padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos e na linhagem celular VERO são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongos e em cultura de célula VERO.

	Camundongo		Cultura de célula VERO		
	L+/100	L+/200	L+/100	L+/50	L+/10
Nível de teste empregado	L+/100	L+/200	L+/100	L+/50	L+/10
Título da toxina	250L+/100/ml	500L+/200/ml	320L+/100/ml	160L+/100/ml	80L+/100/ml
Volume de antitoxina administrado em cada modelo experimental	0,1ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
Antitoxina (UI) padrão administrada em cada modelo experimental	0,01UI	0,005UI	0,01UI	0,02UI	0,1UI
Volume de toxina administrado em cada modelo experimental	0,1ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
Volume final	0,2ml	0,15ml	0,15ml	0,15ml	0,15ml
Menor concentração de antitoxina detectada	0,1UI/ml	0,1UI/ml	0,2UI/ml	0,4UI/ml	2UI/ml

Na padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em cultura de célula VERO, dentre os níveis de teste empregados, L+/200 foi o que apresentou melhor correlação com o nível de L+/100, empregado na padronização da toxina alfa de *C. novyi* tipo B em camundongo. Como pode ser visto na Tabela 2, o título da toxina alfa no sistema célula foi o dobro do título obtido no sistema camundongo, entretanto, o volume de toxina foi a metade do empregado no bioensaio, demonstrando uma proporcionalidade entre os níveis de teste L+/100, aplicado no sistema camundongo, e L+/200, aplicado no sistema célula, o que possibilitou a obtenção de títulos de soros no teste de soroneutralização no sistema célula semelhantes aos obtidos pelo teste no sistema camundongo. Outro parâmetro

considerado para a seleção deste nível de teste foi a capacidade de se detectar títulos mais baixos de anticorpos, aliado à utilização de menor quantidade de toxina alfa na titulação dos soros no teste de potência, resultando em economia, quando comparado com os outros níveis de teste empregados para o sistema célula neste trabalho.

Os títulos de anticorpos neutralizantes nos soros de ovinos, caprinos e coelhos imunizados com vacinas clostridiais comerciais, que continham em sua composição toxina alfa de *C. novyi* tipo B, determinados pelo teste de soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Títulos de anticorpos neutralizantes contra toxina alfa de *C. novyi* tipo B em animais imunizados com toxóide alfa determinados pelo teste de soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO.

Identificação	Título (UI/ml)	
	SN em camundongo	SN em cultivo celular
Ovinos		
01	34,56	29,86
02	28,80	24,88
03	34,56	29,86
04	8,64	7,20
05	10,00	8,64
06	20,00	14,93
Caprinos		
01	20,00	17,28
02	17,28	12,44
03	20,00	14,93
04	10,00	10,37
05	40,00	35,83
06	28,80	24,88
“Pools” dos soros dos coelhos		
T1	1,69	2,5
T2	17,28	20,74
T3	4,32	5,18
T4	4,32	4,32
T5	6,00	6,22
T6	14,40	14,4
T7	8,64	8,64
T8	5,00	5,18
T9	4,32	5,18
T10	17,28	14,40

Utilizando-se o teste de Lilliefors pôde-se observar que os títulos têm uma distribuição normal e pela aplicação dos testes de Cochran e Bartlett pôde-se observar a homogeneidade das variâncias, o que permitiu a utilização do teste t para comparação das médias dos tratamentos aplicados por espécie animal utilizada.

A comparação dos títulos de anticorpos antitoxina alfa de *C. novyi* tipo B, em soros dos animais imunizados, determinados pela soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO foi estatisticamente igual dentro do grupo de cada espécie (ovinos, caprinos e coelhos), com $p < 0,05$. Ou seja, utilizando-se o teste t é possível afirmar não haver diferença significativa entre os títulos obtidos pela soroneutralização em camundongos e os títulos obtidos pela soroneutralização em

cultivo de célula, dentro de cada uma das espécies utilizadas neste experimento.

Utilizando-se o método paramétrico Quadrado de Pearson, pôde-se estabelecer uma correlação de 98,38% ($r = 0,9838$) com $p < 0,01$ entre os títulos de anticorpos antitoxina alfa, nos soros dos animais imunizados, pela técnica de soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO (Figura 3). O valor de $r = 0,9838$ indica uma alta correlação positiva entre os valores dos títulos de anticorpos obtidos na soroneutralização em animais e em célula, pois os pontos estão próximos a linha imaginária, seguindo uma direção ascendente, demonstrando que a variação de uma das variáveis (X) acompanha proporcionalmente a variação da outra (Y).

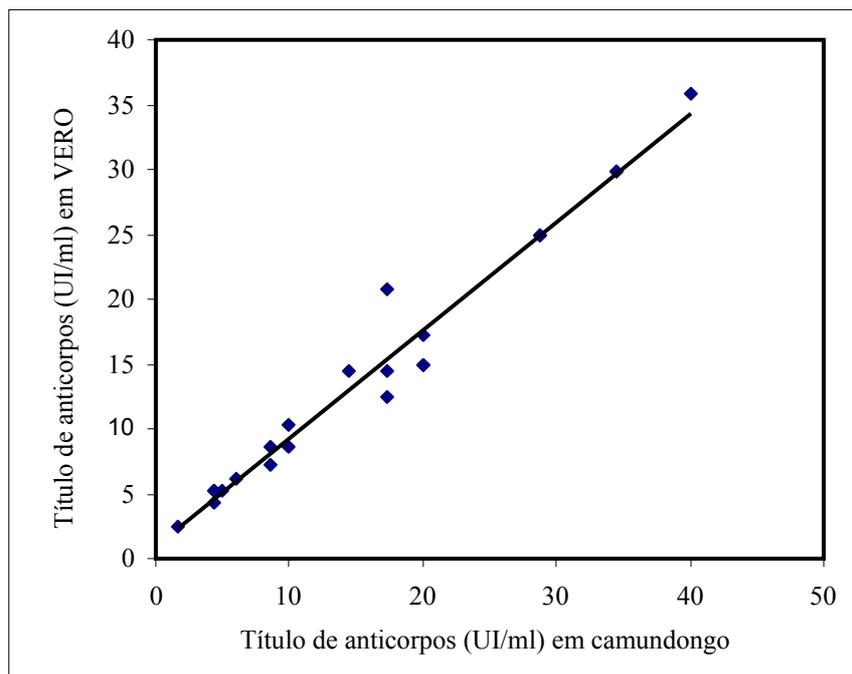


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos antitoxina alfa de *C. novyi* tipo B em soros de animais imunizados, determinados pela soroneutralização em camundongos e em cultura de célula VERO, $r = 0,9838$.

Este resultado é superior aos encontrados por Borrmann et al. (2006), que determinaram os títulos de antitoxina alfa em dois grupos de soros de coelhos que foram imunizados com duas vacinas (A e D), que continham toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, e estabeleceram coeficientes de correlação entre os títulos obtidos pelo ensaio em cultura de célula e no bioensaio animal de 80 e 90%, respectivamente. Correlações significativas entre títulos de anticorpos determinados pela soroneutralização em camundongo e em cultura de célula também foram encontradas por outros autores. Knight et al. (1990a) e Salvarani (2007) estabeleceram correlação de 91% e 99,12%, respectivamente, entre os títulos de anticorpos antitoxina alfa de *C. septicum*, obtidos pela soroneutralização em camundongos e em cultivo de célula VERO. E Souza Júnior (2005) relata uma correlação de 99,73% entre os títulos antitoxina épsilon de *C. perfringens* tipo D determinados pelo ensaio em célula MDCK e em camundongos.

O uso do cultivo celular como modelo revelador da toxina livre no teste de soroneutralização demonstrou ser capaz de determinar títulos de anticorpos em soros de animais vacinados com toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, de forma precisa, sensível, prática e rápida, sem a utilização de camundongos, como também demonstrado em diferentes trabalhos nesta área realizados por Knight et al. (1990a), Souza Júnior (2005), Borrmann et al. (2006) e Salvarani (2007).

Porém, métodos “in vitro” podem não refletir o mesmo nível de complexidade do mecanismo de patogenicidade que causa a morte no teste de soroneutralização em camundongos. Knigh et al. (1990b) e Souza Júnior (2005) demonstraram que o uso de linhagens celulares para a titulação da toxina beta produzida por *C. perfringens* tipos B e C não poderia ser utilizada em substituição ao bioensaio em camundongos, pois a atividade biológica da toxina que causa a morte do camundongo e a ação dermonecrótica em cobaias, é distinta

daquela que causa efeito citopático em linhagem celular.

O uso do cultivo celular apresenta vantagens quando comparado a outros métodos sorológicos, como o ELISA, pois no sistema célula detectam-se anticorpos neutralizantes, enquanto que o ELISA detecta anticorpos contra qualquer epítipo presente na toxina. Além disso, o sistema célula não requer o uso de toxinas purificadas ou uso de anticorpos monoclonais como alguns ELISAs.

A comparação de resultados de métodos “in vitro” com resultados obtidos em animais de experimentação é o ponto mais importante para validação do método “in vitro” (Hendriksen et al., 1998). A técnica “in vitro” deve ser submetida a diversas etapas do processo de validação para que os resultados sejam avaliados por organizações regulatórias internacionais e nacionais, e empregada para teste de potência de toxóides clostridiais. Dentre as etapas, destaca-se a triagem interlaboratorial cega, que inclui a distribuição de materiais e reagentes para a realização do teste pelos laboratórios selecionados. Este pode ser um fator limitante quando se refere ao uso de cultura de célula. Por se tratar de um modelo vivo, diversos fatores relacionados ao cultivo da célula, número de passagens, condições laboratoriais para manutenção e manipulação da célula, profissionais treinados para manipulação da célula, podem resultar em diferenças de resultados entre os laboratórios.

A análise estatística dos resultados obtidos neste experimento demonstrou não haver diferença entre os títulos dos soros obtidos pela soroneutralização em camundongos e em cultivo de célula, e uma alta correlação de 98,38% entre eles. O que permite afirmar, que a utilização da soroneutralização em cultura de célula VERO, na avaliação de potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B, pode ser utilizada como método alternativo ao teste de soroneutralização em camundongos, considerado o teste “padrão ouro”,

reduzindo substancialmente a utilização de animais experimentais para este fim, atendendo os anseios bioéticos.

5. CONCLUSÕES

O teste de soroneutralização em cultura de célula VERO pode ser utilizado para teste de potência de toxóide alfa de *C. novyi* tipo B em substituição ao bioensaio em camundongos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIMOTO, K.; SASAKI, O.; ISOGAI, M. et al. The protective effect of *Clostridium novyi* tipo B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *Journal Veterinary Medicine Science*, v.60, n.6, p.681-685, Kyoto, Japão, 1998.
- ASSIS, R.A.; DIAS, L.D.; PARREIRAS, P.M. et al. Principais clostridioses dos ruminantes. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, suplemento Técnico, v.7, n.22, 2001.
- AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, n.03, p.239-242, 1998.
- BALL, D.W.; VAN TASSELL, V.; ROBERTS, M.D. et al. Purification and characterization of alpha toxin produced by *Clostridium novyi* tipo A. *Infection and immunity*, v.61, n.07, p.2912-2918, 1993.
- BETTE, P.; FREVERT, J.; MAULER, F. et al. Pharmacological and biochemical studies of cytotoxicity of *Clostridium novyi* type A alpha-toxin. *Infection and immunity*, v.57, n.08, p.2507-2513, 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49 de 12 de maio de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- BORRMANN, E.; SCHULZE, F. Detection of *Clostridium novyi* tipo B α toxin by cell culture systems. *FEMS Immunol. Med Microb.*, v.24, p.275-280, 1999.
- BORRMANN, E.; SCHULZE, F.; CUSSLER, K. et al. Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novyi* alpha toxin. *Vet. Microb.*, v.114, p.41-50, 2006.
- BRITISH PHARMACOPEIA. Veterinary Antisera and Veterinary Vaccines. 3.ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.
- CARDELLA, M.A.; DUFF, J.T.; GOTTFRIED, et al. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. *Bacteriological*, v.75, p.360-365, 1958.
- CUSSLER, K.; BORRMANN, E.; E. WERNER. Progress in the replacement of animal experiments in the quality control of clostridial vaccines. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v.109, p.172-177, 2002.
- EBERT, E.; OPPLING, V.; WERNER, E. et al. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β - and ϵ -toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immunol. Med Microb.*, v.24, p.299-311, 1999.
- ESTADOS UNIDOS. Code of Federal Regulations. Washington: office of the Federal Register National Archives and Record Administration. 9CFR113.108. Sec. 113.108 *Clostridium Novyi* Bacterin-Toxoid. 2008. Disponível em: <<http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=cfaf9409578171539fb5804ef1f97289&rgn=div8&view=text&node=9:1.0.1.5.51.0.77.56&idno=9>>. Acesso em 09 de novembro de 2008.
- HARBOLA, P.C.; VERMA, J.G. Immunogenic response to *Clostridium novyi* type B toxóide in guinea pigs and sheep. *Indian Veterinary Journal*, v.65, p.658-660, 1988.

- HATHEWAY, C. L. Toxigenic Clostridia. *Clin. Microb. Rev.*, v.3, p.66-98, 1990.
- HENDRIKSEN, C.; GARTHOFF, B.; AGGERBECK, H.; et al. Alternatives to animal testing in the quality control of immunobiologicals: current status and future prospects. *ATLA*, v.22, p.420-434, 1994.
- HENDRIKSEN, C.; SPIESER, J.; AKKERMANS, A.; et al. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. *ATLA*, v.26, p.747-761, 1998.
- KELLY, W.R. The liver and biliary system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. *Pathology of domestic animals*, 3ed. Orlando: Academic Press, 1993, v. 2, p. 239- 341.
- KNIGHT, P.A.; TILLERAY, J.H.; QUEMINET, J. *In vitro* test for the measurement of veterinary Clostridial toxins, toxoids and antisera. I. Titration of *Clostridium septicum* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*, v.18, p.181-189, 1990a.
- KNIGHT, P. A.; QUEMINET, J.; BLANCHARD, J.H. et al. *In vitro* tests for the measurement of Clostridial toxins, toxoids and antisera. II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*, v.18, p.263-270, 1990b.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Vet.*, v.19, p.29-33, 2000.
- LOBATO, F.C.F.; MORO, E. UMEHARA, O. et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.04, p.313-318, 2000.
- METZ, B.; HENDRIKSEN, C.F.M.; JISKOOT, W. et al. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine*, v.20, p.2411-2430, 2002.
- MIYASHIRO, S., NASSAR, A. F. C.; SOUZA, O. S. Hepatite necrótica infecciosa em bovinos - Relato de Caso. In: 19º Reunião anual do Instituto Biológico, São Paulo, 2006.
- MULLER, H.; EICHEL-STREIBER, C.V.; HABERMANN, E. Morphological changes of cultured endothelial cells after microinjection of toxins that act on the cytoskeleton. *Infection and immunity*, v.60, n. 07, p.3007-3010, 1992.
- NASCIMENTO, R.A.P. *Avaliação da eficiência de vacinas contra Clostridium novyi tipo B*. 2003. 34f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OKSCHE, A. NAKOV, R.; HABERMANN, E. Morphological and biochemical study of cytoskeleton changes in cultured after extracellular application of *Clostridium novyi* alpha-toxin. *Infection and immunity*, v.60, n. 07, p.3002-3006, 1992.
- OIE, Office International des Epizooties. Manual de Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Principles of Veterinary Vaccine Production. 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/1.1.08_VACCINE_PRODUCTION.pdf>. Acesso em 09 de novembro de 2008.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D.; et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriol.*, v.179, n.20, p.6480-6487, 1997.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.1937p.
- ROBLES, C. A.; KERBAGE, O. K.; MOREIRA, A.R. Hepatitis Infecciosa Necrosante em ovinos Merino de la Patagônia Argentina, parasitados com *Thysanosoma actinioides*. *Arch. Méd. Vet.*, v.32, p.125-133, 2000.

SALVARANI, F.M. *Padronização de um teste de potência de toxóide alfa de Clostridium septicum em linhagem contínua de célula*. 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal. *Compêndio de produtos veterinários*, 2008. Disponível em: < <http://www.cpv.com.br/cpv/index.html> >. Acesso em: 09 de novembro de 2008.

SONGER, J.G. Clostridial diseases of small ruminants. *Vet. Res.*, v.29, p.219-232, 1998.

SOUZA JÚNIOR, M.F. *Teste de neutralização para toxina épsilon e titulação de toxinas beta e épsilon de Clostridium perfringens tipos C e D em cultura de células*. 2005. 31f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STERNE, M.; BATTY, I. *Patogenic Clostridia*. London: Butlerworths & CO, 1975.p.143.

TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUM, P.E. et al. Genus *Clostridium*: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. European Concerted Action, 2006. 214p.

UZAL, F. A.; OLAECHEA, F. V.; VANNELLI, S. A. Un caso de hepatic infecciosa necrosante en oveja sin *Fasciola hepatica*. *Ver. Méd. Vet.*, v.77, p.377-379, 1996.

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

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