

Felipe Masiero Salvarani

**PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE POTÊNCIA DE TOXÓIDE DE
CLOSTRIDIUM SEPTICUM 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 de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Co-Orientadora: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

S182p Salvarani, Felipe Masiero, 1982-

Padronização de um teste de potência de toxóide de *Clostridium septicum* em linhagem contínua de célula / Felipe Masiero Salvarani.
- 2007.

30 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

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

Inclui bibliografia

1. *Clostridium* – Teses. 2. Vacinas veterinárias – Teses. 3. Animais de laboratório – Teses. 4. Células – Cultura – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Lobato, Zélia Inês Portela. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 616.931

Folha de assinaturas

DEDICATÓRIA

Dedico mais esta conquista aos meus Pais, Maria José Masiero Salvarani e Luiz Fábio Salvarani, pelo exemplo, amor e por renunciarem aos seus sonhos para tornar os meus realidade.

Ao meu irmão, que meus passos o inspirem a lutar pelos seus ideais.

Aos todos os meus familiares, em especial minha avó Nair, por todo amor a mim dedicado.

A minha família de Palma, em especial a Betinha por sempre ter acreditado que eu seria um vencedor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Lobato, por ser além de meu orientador e exemplo profissional, um segundo pai guiando meus passos na vida acadêmica e científica.

À Professora Zélia Lobato pela co-orientação, ensinamentos e por me mostrar que na vida nada sem esforço e dedicação tem valor.

Ao Dr. Ronnie Antunes de Assis pela amizade, presteza, incentivo, valorização pessoal e por acreditar na nossa parceria nas publicações científicas.

Ao Professor Marcos Bryan pela simplicidade, amizade e reconhecimento.

Aos professores Marcos Xavier Silva e Ângela Maria Quintão pela ajuda na análise estatística e interpretação dos resultados.

Aos professores Marília Martins Melo e Andrey Pereira Lage pela amizade, incentivo e trabalho junto ao Colegiado de Ciência Animal.

À amiga Catarina Dourado por todo apoio na realização do experimento, pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Aos alunos de Iniciação Científica e futuros colegas de Pós Graduação, Rodrigo Otávio e Prhiscylla Sadanã, pela ajuda, incentivo, paciência, respeito e por me permitirem ser mesmo que de maneira utópica o “orientador” deles.

Às “meninas” do Laboratório de Virologia, em especial, Cíntia Fávero, Fábila Campos, Tércia Ludolfo, Priscilla Gerber e Amanda Soriano pelo excelente convívio, amizade e risadas.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Grazielle Cossenso e Eduardo Nogueira, pela dedicação ao trabalho, ajuda e amizade.

Aos funcionários do Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal, em especial Heloisa, Nilda e Débora pela dedicação ao trabalho, paciência e amizade.

À Nádia pelo carinho, presteza e paciência na formatação desta dissertação.

À Lúcia pela alegria, amizade e seriedade na limpeza do laboratório.

Ao Alexandre Penna, representando todos os funcionários do LANAGRO/MG.

Aos grandes amigos Kenia Fonseca, Luana Campos, Mariana Martins, Eduardo Palmieri, Eduardo Lara, Julia Angélica, Luciana Salles, Luciana Faria, Paula Pessoa, Lina Antunes, Lucas Paim e Raquel Fernandes por acreditarem e me incentivarem nessa nova empreitada.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

E a todos que não citei o nome, mas que foram essenciais para realização de mais este sonho.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. LITERATURA CONSULTADA.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local de realização do experimento	15
3.2. Animais utilizados	15
3.3. Culturas de células	15
3.3.1. Linhagem celular.....	15
3.3.2. Meios, soluções e reagentes	16
3.4. Soro padrão e soros teste.....	16
3.4.1. Soro padrão	16
3.4.2. Soros teste	16
3.5. Produção da toxina alfa	16
3.5.1. Amostra de <i>Clostridium septicum</i>	16
3.5.2. Cultivo e manutenção da amostra	16
3.5.3. Produção e concentração da toxina alfa	17
3.5.4. Tipificação da toxina	17
3.5.5. Titulação da toxina alfa nos três modelos experimentais.....	17
3.5.5.1. Titulação da toxina alfa em camundongos	17
3.5.5.2. Titulação da toxina alfa em cobaios	18
3.5.5.3. Titulação da toxina alfa em célula	18
3.6. Padronização da toxina alfa nos três modelos experimentais	18
3.6.1. Padronização da toxina alfa em camundongo	18
3.6.2. Padronização da toxina alfa em cobaio	18
3.6.3. Padronização da toxina alfa em célula	18
3.7. Teste de potência do toxóide alfa nos três modelos experimentais.....	19
3.7.1. Soroneutralização em camundongo	19
3.7.2. Soroneutralização em cobaio	19
3.7.3. Soroneutralização em célula	19
3.8. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE TABELAS	
Tabela 01: Provas bioquímicas da amostra <i>C. septicum</i> ATCC 12464.	20
Tabela 02: Titulação da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em camundongo, cobaio e célula VERO.	22
Tabela 03: Padronização da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em camundongo (L+/5), cobaio (L+/5) e célula VERO (L+/25).	23
Tabela 04: Nível de anticorpos neutralizantes anti-toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em “pool” de soros de coelhos imunizados pelo teste de soroneutralização em camundongo, cobaio e célula VERO.	24
LISTA DE FIGURAS	
Figura 01: Eletroforese em gel de agarose da PCR multiplex de <i>Clostridium chauvoei</i> e <i>Clostridium septicum</i>	21
Figura 02: Concentração celular da amostra de <i>C. septicum</i> ATCC 12464, medida por densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com absorbância de 600 nm durante as 15 horas de produção da toxina alfa em biorreator.....	22
Figura 03: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em soros de coelhos obtidos por meio da técnica de soroneutralização em camundongo e cobaio, $r = 1$	25
Figura 04: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em soros de coelhos obtidos por meio da técnica de soroneutralização em camundongo/cobaio e célula, $r = 0,9912$	26

RESUMO

Clostridium septicum é o principal patógeno responsável pelo quadro de edema maligno. Devido à ação citotóxica da toxina alfa as infecções geralmente são fatais. Para o controle da doença é utilizado a vacinação com toxóide alfa. O teste de potência das vacinas clostridiais é realizado através da técnica de soroneutralização em camundongos ou teste intradérmico em cobaio, porém com o objetivo de estudar técnicas alternativas *in vitro* padronizou-se um método para detecção de anticorpos neutralizantes utilizando cultura de células. Os títulos observados na soroneutralização em cultivo celular, obtidos a partir do soro de coelhos vacinados frente à toxina alfa de *C. septicum* padronizada nos níveis de teste prescritos pela Farmacopéia Britânica, demonstraram resultados com significativa correlação quando se compara aos modelos animais. O indicador cultura de célula é mais sensível do que os modelos *in vivo*, permitindo a detecção de títulos de anticorpos substancialmente mais baixos. Conclui-se que a soroneutralização em cultura de célula é uma alternativa ao uso dos indicadores de letalidade em camundongos e dermonecrótico em cobaios na titulação de soros na avaliação da potência de vacinas contra *C. septicum*.

Palavras-chave: *Clostridium septicum*, toxina alfa, soroneutralização, vacina, camundongo, cobaio, cultura de células.

ABSTRACT

Clostridium septicum is the pathogen that causes the malignant edema. Because of its strong cytotoxic alpha toxin, infections are often lethal. To prevent losses in animal, vaccination with alpha toxoid vaccines is carried out. The potency test of the vaccines have to be done by neutralization test in mice or intradermally into guinea-pig skin. An alternative method to detect neutralizing antibodies based on the use of cell cultures was standardized. Cell culture titrations of *C. septicum* alpha toxin performed on rabbit at the levels of test prescribed by British Pharmacopeia have produced consistent results which agree closely with animal models. Cell culture indicators are more sensitive than *in vivo* methods, permitting detection of substantially lower titers than possible *in vivo* indicators. It concluded that cell culture titration offers a valid *in vitro* alternative to the use mouse lethal and guinea-pig dermonecrotic indicators for the titration of sera of potency test of *C. septicum* alpha toxin vaccines.

Key words: *Clostridium septicum*, alpha toxin, serum neutralization, vaccine, mice, guinea pig, cell culture.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de clostrídios, de importância veterinária, *Clostridium septicum* destaca-se como agente etiológico de mionecroses e enterotoxemias, enfermidades que afetam os ruminantes e outras espécies de animais domésticos, determinando perdas aos sistemas de criação. As patogenias destas doenças envolvem a multiplicação do microrganismo, com conseqüente produção de toxinas levando ao quadro nosológico. *C. septicum* produz quatro toxinas principais: alfa (hemolítica, necrotizante e letal), beta (DNase), gama (hialuronidase) e delta (hemolisina). A toxina alfa é a principal proteína envolvida nos quadros patológicos devido às suas atividades biológicas (Hatheway, 1990).

A mionecrose causada pelo *C. septicum*, e em menor freqüência pelo *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* ou a associação entre os agentes é denominada gangrena gasosa ou edema maligno, patologia na qual a musculatura e o tecido subcutâneo são primariamente acometidos, com conseqüente lesão muscular e toxemia. Vários fatores podem facilitar a penetração dos agentes e desencadear a infecção, como feridas cirúrgicas ou acidentais, castração, tosquia, parto, punção venosa, vacinação, realizadas sem assepsia (Assis et al., 2002). Uma condição particular, que envolve ovinos, é uma enterotoxemia denominada “Braxy”, caracterizada por injúrias na parede do abomaso, entretanto a enfermidade está restrita a determinadas regiões geográficas, não ocorrendo no Brasil (Songer, 1996).

Os prejuízos econômicos causados pela gangrena gasosa são difíceis de serem avaliados devido à ausência de dados epidemiológicos, entretanto, em razão da alta letalidade estima-se que estes sejam elevados (Baldassi et al., 1985). Particularmente, em Minas Gerais, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2005 foram registrados, segundo o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do

Estado de Minas Gerais, 14.895 casos de mionecroses, representadas pelo carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, atingindo um dos maiores índices de mortalidade entre as doenças infecciosas de bovinos (Solange Olinda, comunicação pessoal)⁽¹⁾. Em 2006, segundo relato de Lima et al., 40 ovinos e 30 caprinos de um rebanho de 1200 animais, vieram a óbito em um surto da doença.

Devido às características ecológicas do agente que é ubiqüitário, sua erradicação é praticamente impossível, sendo seu controle baseado em medidas preventivas de manejo e vacinação sistemática de todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as doenças (Lobato e Assis, 2000).

A utilização de imunógenos tem reduzido, em grande parte, a mortalidade e conseqüentes perdas econômicas relacionadas às clostridioses. No Brasil são produzidas em torno de 148 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, comprovando a grande utilização desses imunógenos (Ronnie Antunes de Assis, comunicação pessoal)⁽²⁾. As vacinas comercializadas no país são compostas de múltiplos antígenos e as normas para controle das mesmas, estão definidas na legislação do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 1997). Entretanto, apenas as vacinas contra *Clostridium chauvoei* e *Clostridium botulinum* são submetidas ao controle oficial pelo MAPA.

A técnica padrão preconizada na realização dos testes de potência de vacinas clostridiais é a soroneutralização em camundongos, porém o teste dermonecrótico em cobaias é uma

⁽¹⁾ Solange Olinda. Comunicação pessoal 2007 (Serviço de Sanidade Animal –SSA/DFA/MG), Minas Gerais, Brasil.

⁽²⁾ Ronnie Antunes de Assis. Comunicação pessoal 2007 (Laboratório Nacional Agropecuário), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

ferramenta alternativa na titulação de anticorpos por reduzir o número de animais utilizados (Knight et al., 1990a). O uso de animais, para esses fins, tem causado inúmeras discussões éticas por grupos humanitários e pesquisadores que visam o bem estar animal.

Os questionamentos bioéticos determinaram a necessidade do desenvolvimento e padronização de métodos alternativos *in vitro* que pudessem apresentar resultados rápidos e confiáveis, com boa sensibilidade e especificidade, aliados a um baixo custo. Dentro dessa linha de pesquisa o uso de linhagens celulares poderá ser uma opção viável e eficaz na substituição dos modelos animais (Metz et al., 2002).

O presente trabalho teve por objetivos titular a toxina alfa de *C. septicum* em célula VERO e padronizar um teste de soroneutralização *in vitro*, para avaliação da potência de toxóide alfa utilizando cultura de células e comparar a sensibilidade e estabelecer correlações entre o modelo padronizado e o bioensaio em camundongos e cobaias.

2. LITERATURA CONSULTADA

Clostridium septicum descrito pela primeira vez por Macé em 1889 (Cato et al., 1986) é um bacilo Gram positivo, anaeróbico estrito, móvel, formador de esporos. Constitui uma importante causa de infecções de feridas em ruminantes, podendo acometer suínos e eqüinos (Smith, 1984). O agente está amplamente distribuído no solo, água doce e salgada, em alimento de origem animal e vegetal, além de ser comensal do trato gastrointestinal (TGI) de animais e do homem (Titball et al., 2006).

O microrganismo tem virulência multifatorial, envolvendo a produção de toxinas e enzimas hidrolíticas, além de ter capacidade de migração (Wilson e Mcfarlane, 1996). Estudos das exoproteínas de *C. septicum* indicam que o agente produz quatro toxinas principais: alfa (hemolítica, necrotizante e letal), beta (DNase), gama (hialuronidase) e

delta (hemolisina). A toxina alfa é a principal proteína envolvida nos quadros patológicos das mionecroses devido às suas atividades biológicas. Seu mecanismo de ação é baseado principalmente na formação de poros na membrana celular, com conseqüente lise osmótica, exibindo uma liberação pré-lítica de íons potássio (Ballard et al., 1992; Gordon et al., 1997; Tweten, 2001). A toxina alfa secretada pelo *C. septicum*, de origem plasmidial e cromossomal, tem peso molecular de 49 kDa e a toxina alfa produzida pelo *C. chauvoei*, de origem cromossomal, tem peso molecular de 53,5 kDa (Hatheway, 1990; Tweten, 2001). Moussa (1958) demonstrou que anticorpos contra toxina alfa de *C. septicum* não neutralizam toxina alfa de *C. chauvoei*, demonstrando não ocorrer proteção cruzada entre as espécies. Esta toxina é conhecida como um dos principais fatores antigênicos responsáveis pela imunidade conferida por vacinas (Amimoto et al., 2002).

A gangrena gasosa ou edema maligno é considerada uma infecção “exógena”, produzida por um ou mais dos seguintes agentes: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* (Assis et al., 2002). Estes microrganismos penetram em feridas cirúrgicas ou acidentais, decorrentes de castração, tosquia, parto, punção venosa, vacinação, ou do cordão umbilical (Morris et al., 2002; Radostits et al., 2002). Estes fatores propiciam uma diminuição do oxigênio molecular, levando a um baixo potencial de óxido-redução nos tecidos, favorecendo a germinação dos esporos dos clostrídios ali localizados, com a conseqüente produção de toxinas principalmente a toxina alfa que causa efeito letal e citolítico (Lobato e Almeida, 1997). Surtos da doença, envolvendo ruminantes, têm sido relatados, nos últimos anos, com elevada mortalidade (Assis et al., 2002; Lima et al., 2006; Costa et al., 2007).

A sintomatologia da gangrena gasosa inclui febre, anorexia, taquicardia e depressão, ocorrendo também toxemia que faz com que o quadro evolua para a morte em poucas horas ou geralmente em um a três

dias (Smith, 1984). As lesões macroscópicas e microscópicas são semelhantes às do carbúnculo sintomático, com ocorrência de edema crepitante nos músculos e tecidos subcutâneos, que inicialmente são quentes e doloridos. Com a evolução da doença, tornam-se frios e indolores, sendo comum a ocorrência de hemorragias e necrose. Em geral na gangrena gasosa a celulite, que afeta principalmente o tecido subcutâneo, é mais freqüente do que a miosite (Buxton e Donachie, 1991).

Uma condição particular de ovinos, determinada por *C. septicum*, é a enfermidade denominada “Braxy”, caracterizada por injúrias na parede do abomaso em decorrência da ingestão de pastagens congeladas que favorecem a infecção pelo microrganismo e o desencadeamento do processo, produzindo lesões locais no abomaso, intestino delgado e toxemia (Songer, 1996). A enfermidade tem limitada importância econômica devido a baixa prevalência e por estar restrita a determinadas regiões geográficas. A doença foi relatada em cordeiros recém-nascidos no Reino Unido (Buxton e Donachie, 1991), assim como em outras partes da Europa, Austrália e Estados Unidos da América (Songer, 1996).

Diferentemente das enterotoxemias causadas pelo *Clostridium perfringens*, do botulismo e do tétano, em que a detecção da(s) toxina(s) produzida pelos agentes envolvidos é imprescindível para o diagnóstico, na gangrena gasosa a detecção dos microrganismos, através do cultivo e isolamento a partir de amostras de fragmentos de músculo lesado, é suficiente para se ter um diagnóstico conclusivo (Baldassi et al., 1985). Alguns métodos imunológicos de diagnóstico podem ser empregados como a imunofluorescência direta, teste “padrão-ouro” para mionecroses, que permite a detecção dos agentes em impressões (claps) obtidas diretamente dos tecidos durante a necropsia (Assis et al., 2005) e em esfregaços de cultivo (Batty e Walker, 1963; Pinto e Abreu, 1992; Assis et al., 2001); a imunohistoquímica em cortes histológicos

e/ou esfregaços de cultivo (Conesa et al., 1995; Vanelli e Uzal, 1996a,b; Assis et al., 2005) e as seguintes técnicas de PCR: que amplificam seqüências conservadas da subunidade 16s rRNA (Kuhnert et al., 1997; Takeuchi et al., 1997; Uzal et al., 2003), da subunidade 16S-23S rDNA (Sasaki et al., 2000 a,b; Sasaki et al., 2001), a que codifica a flagelina de *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* tipos A e B e *C. haemolyticum* (Sasaki et al., 2002) e a que codifica a flagelina de *C. novyi* e a toxina alfa de *C. septicum* (Assis, 2005).

Em relação às medidas aplicadas para o controle e profilaxia das patologias causadas pelo *C. septicum*, verifica-se que embora o agente seja sensível à penicilina e outros antibióticos de amplo espectro, estes são de pouco ou nenhum valor para o tratamento, pois em geral os animais são encontrados mortos ou em estado agônico. Ao mesmo tempo, devido às características ecológicas do agente que é ubiqüitário, as medidas gerais a serem adotadas nos sistemas de criação se restringem a cuidados de manejo e na administração de imunógenos (Lobato e Assis, 2000).

O controle é baseado na imunização dos animais com bacterinas e/ou toxóides específicos (Lobato e Almeida, 1997). As vacinas clostridiais são na sua grande maioria polivalentes, contendo em sua composição múltiplos antígenos, sendo empregadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e/ou produtos tóxicos. Tais imunógenos devem ser administrados por via subcutânea, preferencialmente, em duas doses intervaladas de 4-6 semanas na primovacinação e reforço anual, com exceção para o *Clostridium haemolyticum* que deverá ser semestral. Quando o rebanho é sistematicamente vacinado, os anticorpos colostrais protegem os animais por até três a quatro meses após o nascimento, devendo então a primovacinação ser realizada após esse período (Lobato e Assis, 2000). Esta estratégia visa minimizar os problemas de manejo, estresse, reações anafiláticas e traumas nas inoculações.

No Brasil são produzidas em torno de 148 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, comprovando a grande utilização desses imunógenos (Ronnie Antunes de Assis, comunicação pessoal, 2007)⁽¹⁾. As vacinas comercializadas no país devem respeitar as normas estabelecidas na legislação do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 1997). Entretanto, apenas as vacinas contra *Clostridium chauvoei* e *Clostridium botulinum* são submetidas ao controle oficial pelo MAPA.

Segundo o regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o carbúnculo sintomático, gangrena gasosa, enterotoxemia e tétano estabelecido pela portaria número 49 do MAPA de 12 de maio de 1997, para avaliação da eficiência do componente *C. septicum* deve-se utilizar como referência as normas estabelecidas pela British Pharmacopeia (1998). Em relação ao *C. septicum*, exige-se nível mínimo de antitoxina alfa de 2,5 UI/ml, determinado pela técnica de soroneutralização em camundongos por meio da titulação de soros de coelhos vacinados.

A efetividade de vacinas inativadas depende principalmente da quantidade e qualidade dos antígenos específicos que contêm, e da escolha adequada de adjuvantes para aumentar o efeito imunizante. Além do aspecto de competição entre antígenos e desses por adjuvantes, outro problema é a habilidade restrita do animal quanto ao mecanismo de produção de anticorpos frente a cada um dos antígenos da mistura (Sterne et al., 1962).

A produção de toxinas é um dos aspectos mais importantes na produção de vacinas, bem como a amostra utilizada, a composição e o pH do meio de cultura empregado, a temperatura e as condições de incubação adotadas (Lobato e Assis, 1999). Embora isto seja uma realidade,

poucos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar as condições ideais, necessárias para produção da toxina alfa de *C. septicum*. Associado a isso, é reconhecido que há sérias dificuldades quanto à preparação desse antígeno pelo fato dos títulos serem variáveis a cada partida. O aumento desses títulos tem sido obtidos através de métodos de concentração que em geral não são rentáveis (Cortinãs et al., 1997).

Choman (1969) avaliou a produção de toxina alfa de *C. septicum* utilizando um meio a base de caldo de fígado em pH 7,6, com período de crescimento estático de 24 e 48 horas e obteve títulos de 100 e 200 DMM/ml (Dose Mínima Mortal), respectivamente. Hnátková et al. (1986), preparam antígenos de *C. septicum* em sacos de diálise, com 24 horas de incubação e sem controle do pH, para imunização de cavalos, e observaram título de toxina de 150 DMM/ml.

Ballard et al. (1992) utilizando meio BHI⁽²⁾ (caldo cérebro coração) suplementado com 0,05% de L-cisteína, em pH 7, com período de crescimento estático variando entre 18 a 24 horas observou título de toxina de 500 DMM/ml. Já Cortinãs et al. (1997) testaram dois sistemas de produção de toxina com o objetivo de determinar as melhores condições para obtenção de antígenos. Foi utilizado o meio Clostridia⁽³⁾, com e sem adição de 0,75 g/L de L-cisteína, incubado por 24 horas e sem controle do pH. O título do sistema onde houve suplementação de carbono foi de 300 DMM/ml, três vezes maior ao obtido no sistema sem suplementação, que foi de 100 DMM/ml. Apesar disso, a atividade hemolítica foi similar para os dois sistemas adotados, sendo a instabilidade da toxina a provável explicação para este achado.

Dias (2003) avaliou a produção de toxina alfa em meio BHI suplementado com 0,05% de L-cisteína por 24 horas e com pH de 7,2. O cultivo obtido foi centrifugado e o sobrenadante concentrado 20 vezes em

⁽¹⁾ Ronnie Antunes de Assis. Comunicação pessoal 2007 (Laboratório Nacional Agropecuário), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

⁽²⁾ Difco Laboratories, USA.

⁽³⁾ Oxoid, USA.

célula de ultrafiltração (AMICON)⁽¹⁾, com membrana de retenção de 10 kDa, obtendo título de 1200 DMM/ml. Dois meses após a produção inicial houve queda no título da toxina concentrada, fato semelhante observado por Ballard et al. (1992) e Cortinãs et al. (1997), o que gerou a necessidade de um novo ensaio de produção da toxina, porém utilizando um inibidor de protease, phenylmethylsulfonyl fluoridre (PMSF)⁽²⁾ na proporção de 10 mM/L.

A soroneutralização (SN) em camundongos é o método imunológico padrão oficialmente utilizado na avaliação da potência vacinal do componente *C. septicum* em vacinas clostridiais no Brasil (Brasil, 1997). Apesar da técnica ser reconhecida pela sua sensibilidade e confiança, é um método demorado (três dias) e em parte impreciso (variações individuais), além de ser relativamente caro, pois requer o uso de grande número de animais (Wood, 1991). Falhas podem ocorrer em decorrência de variações individuais da sensibilidade animal e de toxicidade específica causada por outras substâncias que podem estar presentes nas amostras clínicas (Naylor et al., 1987).

O teste dermonecrótico em cobaios é uma ferramenta alternativa ao teste de soroneutralização em camundongos por reduzir o número de animais utilizados, pois um mesmo animal pode ser utilizado para avaliação de dois soros diferentes, aplicando-se um a cada lado do animal (Knight et al., 1990a).

Porém, com as discussões éticas por parte de grupos humanitários e pesquisadores, quanto à utilização de animais de laboratório, os testes *in vivo* passaram a não encontrar a aceitabilidade de antes, impulsionando o desenvolvimento e estabelecimento de métodos alternativos *in vitro* (Roth et al., 1999). As técnicas *in vitro*, quando comparadas aos bioensaios em animais, apresentam as vantagens de rapidez de resultados, maior especificidade

e viabilidade econômica, além de evitar questionamentos bioéticos (El Idrissi e Ward, 1992) devido à possibilidade de reduzir substancialmente o número de animais utilizados (Roth et al., 1999; Wood, 1991).

Testes *in vitro* têm sido descritos como de fundamental importância como métodos de diagnóstico e de avaliação de potência de vacinas em indústrias e órgãos oficiais de saúde animal. O uso do cultivo celular vem sendo descrito como uma alternativa viável na substituição ao uso de animais de laboratório, apresentando correlações satisfatórias quando comparados ao bioensaio animal, além de minimizar alguns problemas, como, por exemplo, a variação individual, detecção de pequenas concentrações de toxina e anticorpos, além de permitir o estudo de fenômenos inacessíveis em tecidos intactos (Levings et al., 1993).

Knigh et al. (1990a) padronizaram um teste de soroneutralização *in vitro* para detecção de anticorpos anti-toxina alfa de *C. septicum* utilizando a linhagem celular VERO (African Green Kidney Monkey) e estabeleceram correlações com os modelos animais. Na produção da toxina para o estudo, obtiveram título de 1.170 DMM/ml em camundongo, 1.580 EDN/ml (Efeito Dermonecrótico) em cobaios e 738.000 ECP/ml (Efeito Citopático) em célula. Na padronização da toxina utilizaram o nível de teste L+/5 para o bioensaio animal e L+/25 para o cultivo celular. Os títulos encontrados na padronização em camundongo, cobaio e célula, foram de 115 L+/5/ml, 155 L+/5/ml e 4720 L+/25/ml, respectivamente. Na realização da soroneutralização *in vivo* e *in vitro*, os autores estabeleceram uma correlação de 91% entre os modelos animais e o cultivo celular.

Roth et al. (1999) ao tentarem detectar anticorpos anti-toxina alfa de *C. septicum*, testaram sete linhagens celulares diferentes para o estabelecimento da sensibilidade destas frente a toxina e determinaram que a linhagem celular VERO foi a mais sensível em detectar menores concentrações da toxina alfa. Concluíram também que é

⁽¹⁾ Millipore Corporation, USA.

⁽²⁾ Sigma Laboratories, USA.

possível detectar anticorpos utilizando o teste *in vitro*, entretanto não realizaram o bioensaio animal não sendo possível o estabelecimento de correlações entre os sistemas.

Knight et al. (1990b) e Souza Júnior (2005) padronizaram um teste de neutralização *in vitro* para titulação da toxina e anti-toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D utilizando a linhagem celular MDCK (Mandin Darby Canine Cells) e obtiveram um correlação de 91% e 99,73%, respectivamente, ao comparar os resultados do cultivo celular com os modelos animais.

Borrmann et al. (2006) padronizaram um teste *in vitro* utilizando a linhagem celular MDCK pra determinar o título de anticorpos anti-toxina alfa de *C. novyi* tipo B e anti-toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Neste trabalho para avaliação da viabilidade celular foi usado o corante MTT com leitura realizada em densidade óptica em leitor de ELISA a 550 nm. Apesar de laboriosa está coloração demonstrou resultados satisfatórios, quando comparada a coloração com cristal violeta (0,1%). A correlação estabelecida pelos pesquisadores na comparação dos modelos animal e celular foi de 75%, a mais baixa entre os trabalhos listados na literatura.

Entretanto, para que estas metodologias *in vitro* possam ser validadas, ou seja, reconhecidas por entidades competentes é imprescindível à determinação de sua especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Levings et al., 1993). Para isto, Roth et al. (1999) destacam a necessidade de trabalhos comparativos entre os testes *in vivo* e *in vitro* envolvendo a neutralização e a titulação de antígenos clostridiais objetivando alcançar uma correlação satisfatória. Desta forma, segundo os autores, seria possível iniciar o processo de prevalidação do método de cultivo celular *in vitro*, utilizando a linhagem celular VERO considerada a mais sensível à toxina alfa de *C. septicum* (Knight et al., 1990; Roth et al., 1999a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, pertencentes à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFGM), e no Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

3.2. Animais utilizados

Na imunização, para cada vacina comercial que continha em sua composição o componente *C. septicum*, foram utilizados oito coelhos adultos, (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia, do sexo feminino, com pesos entre 1,8 e 2,6kg, adquiridos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFGM. Para a titulação da toxina alfa e padronização dos testes de soroneutralização foram utilizados 420 camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, com peso variando de 17 e 22g, do sexo feminino; e 18 cobaias, *Cavia porcellus*, linhagem English Short Ear, do sexo feminino, com pesos entre 350 e 450g cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

A utilização destes animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo número 51/2007.

3.3. Cultura de células

3.3.1. Linhagem celular

A linhagem contínua celular utilizada foi a "African Green Kidney Monkey" (VERO ATCC CCL-81), cedida pelo Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. A escolha

da linhagem celular foi baseada na literatura disponível por ser considerada a mais sensível à toxina alfa de *C. septicum* (Knight et al., 1990a; Roth et al., 1999).

3.3.2. Meios, soluções e reagentes

A célula VERO foi cultivada no meio essencial mínimo⁽¹⁾ (MEM), suplementado com soro fetal bovino⁽²⁾ (SFB) 5% (v/v), penicilina e estreptomicina nas concentrações de 200UI e 200µg, respectivamente. Anfotericina B e glutamina nas concentrações finais de 0,25mg e 2Mm, respectivamente, para 100ml de MEM. Foram usadas solução salina fosfatada (PBS) – pH 7,2 (NaCl 8,0g; KCl 0,20g; Na₂HPO₄H₂O 1,13g; KHPO₄ 0,20g; H₂O Milli-Q qsp 1000ml) e solução de tripsina/versene⁽²⁾ (STV) de acordo com Andrade (2000).

A linhagem celular foi cultivada em frascos de 150cm³, até a confluência mínima de 90%, em estufa úmida, com atmosfera controlada de 5% CO₂ a 37°C. As células foram contadas após os procedimentos de lavagem da monocamada com PBS e tripsinização da mesma com a solução de tripsina/versene (STV). Os ensaios foram padronizados em placas de 96 poços⁽³⁾ de fundo plano, para cultivo celular na concentração de 2,5x10⁴ células/ml (Knight et al., 1990a).

3.4. Soro padrão e soros teste

3.4.1 Soro padrão

Na padronização da toxina alfa foi utilizado um soro padrão anti-alfa toxina de *Clostridium septicum* contendo 1100UI adquirido junto ao National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC – Inglaterra).

3.4.2. Soros teste

Foram utilizados 11 soros teste, denominados T1 a T11, obtidos de coelhos imunizados com vacinas clostridiais disponíveis no mercado nacional no ano de 2007 e que continham em sua composição *C. septicum*. Para cada vacina foram utilizados oito coelhos, inoculados por via subcutânea, com a menor dose recomendada pelo fabricante (British Pharmacopeia, 1998). No grupo controle negativo a vacina foi substituída por salina estéril a 0,85%. No grupo controle positivo foi utilizado toxóide alfa de *C. septicum* padrão adquirido junto ao National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC – Inglaterra). Os animais receberam a primeira dose da vacina, do toxóide padrão e da solução salina 0,85% no dia 0 e uma segunda dose no dia 21. Todos os animais foram sangrados 14 dias após a segunda vacinação. Os soros dos oito animais de cada grupo foram misturados em partes iguais constituindo-se um “pool” para cada vacina (British Pharmacopeia, 1998). Os soros foram estocados a -20°C até a realização dos testes.

3.5. Produção da toxina alfa

3.5.1. Amostra de *Clostridium septicum*

Para a produção da toxina alfa foi utilizada a amostra de *Clostridium septicum* (ATCC-12464) adquirida junto ao American Type Culture Collection (ATCC) dos Estados Unidos da América.

3.5.2. Cultivo e manutenção da amostra

A amostra liofilizada foi reconstituída pela adição de 1,0ml de meio BHI⁽⁴⁾ (Caldo Cérebro Coração) e semeadas em dois tubos de rosca (15X160 mm) contendo 10,0ml de caldo BHI e em duas placas de ágar sangue de carneiro 5%. Os tubos e uma placa foram incubados a 37°C por 24 horas em atmosfera de anaerobiose (10% de CO₂, 10% de H₂ e 80% de N₂). A outra placa foi mantida em aerobiose em estufa a

⁽¹⁾ Gibco Laboratories, USA.

⁽²⁾ Difco Laboratories, USA.

⁽³⁾ Sarstedt, USA.

⁴ Difco Laboratories, USA.

37°C por 24 horas para avaliação da esterilidade. As amostras foram avaliadas quanto a pureza pela coloração de Gram, e a identidade confirmada por provas bioquímicas (Sterne e Batty 1975) e pelas técnicas da IFD (Assis, et al. 2001) e PCR Multiplex (Assis, 2005).

Para manutenção das amostras foram feitos inóculos (1/10) em cinco tubos de rosca contendo 9,0ml de caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas em anaerobiose. Os crescimentos obtidos foram centrifugados a 8000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em leite em pó integral a 10% e liofilizado segundo Rudge (1983).

3.5.3. Produção e concentração da toxina alfa

Para a produção da toxina alfa de *C. septicum* foi utilizado um biorreator de bancada (BioFlo 110)⁽¹⁾ com volume da dorna de 5,0L. O biorreator é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, dispondo de controle de velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio que permitem manter uma atmosfera anaeróbia no início do ensaio. O aparelho possui um sistema automático de controle de temperatura e pH, além de permitir a colheita de alíquotas para a dosagem da concentração celular, a qual foi quantificada através da medida de densidade ótica (DO) em espectrofotômetro lida a 600 nm.

O meio utilizado na fermentação foi o BHI suplementado com 0,05% de cisteína (Ballard et al., 1992), que foi reconstituído de acordo com a recomendação do fabricante e a cisteína foi adicionada imediatamente antes da autoclavação a 121°C, por 20 minutos dentro da dorna do aparelho. O pré-inóculo de colônias típicas obtidas no ágar sangue, foi transferido na proporção de 10% (v/v) para o meio BHI suplementado no biorreator, sob atmosfera de anaerobiose, pH e temperatura controlados por 15 horas. Após crescimento 5000 ml da cultura foi centrifugado a 8000 x g por 30 minutos e o sobrenadante

concentrado 100 vezes por ultrafiltração em sistema Amicon⁽²⁾ a 4°C, com membrana de retenção de 10 kDa (Ballard et al., 1992; Cortinãs et al., 1997; Amimoto et al., 2002; Dias, 2003), até obter um volume final de 50 ml. A este volume foi adicionado um inibidor de protease, PMSF⁽³⁾ (phenylmethylsulfonyl fluoride), na proporção de 10mM/L (Ballard et al., 1992). A toxina foi alíquotada em eppendorf e armazenada a -80°C.

3.5.4. Tipificação da toxina

Para confirmação do tipo de toxina utilizada foi empregada a metodologia descrita por Lobato (1989) com modificações que consiste na mistura de 1,0ml da toxina em diferentes diluições com 1,0ml de antitoxina padrão homóloga contendo 1,0 UI/ml. As misturas foram mantidas em banho-maria, a 37°C por 30 minutos e em seguida 0,2ml foram inoculados por via endovenosa, em dois camundongos por diluição e os animais observados por um período de 72 horas. Como controle positivo foi inoculada somente a toxina, como controle negativo foi inoculada solução salina 0,85% estéril e como controle do soro foi inoculado antitoxina padrão, todos na mesma dose e via de inoculação.

3.5.5. Titulação da toxina alfa nos três modelos experimentais

3.5.5.1. Titulação da toxina alfa em camundongos

Na titulação da toxina em camundongos foram empregadas diluições seriadas na base dois, em salina peptonada a 1%. De cada diluição foram inoculados 0,2ml da solução por via endovenosa em cinco camundongos. Os animais foram observados por 72 horas, e a dose mínima mortal por ml – DMM/ml determinada segundo a British Pharmacopeia (1998).

⁽¹⁾ New Brunswick Scientific C.O., UK.

⁽²⁾ Millipore Corporation, USA.

⁽³⁾ Sigma Laboratories, USA.

3.5.5.2. Titulação da toxina alfa em cobaios

Na titulação da toxina em cobaios foram empregadas diluições seriadas na base dois, em salina peptonada a 1%. De cada diluição foram inoculados, em duplicata, 0,2ml da solução por via intradérmica em um único cobaio. O animal foi observado por 48 horas, e o efeito dermonecrótico por ml – EDN/ml determinado segundo (Glenny et al., 1931).

3.5.5.3. Titulação da toxina alfa em célula

A titulação foi realizada em quadruplicata, sendo 100µl da toxina adicionados nos quatro primeiros poços da placa de 96 wells, e nos demais foram adicionados 50µl de MEM suplementado. Procedeu-se a diluição da toxina na base dois, e adicionou-se mais 50µl de MEM e 50µl do cultivo celular contendo $2,5 \times 10^4$ células, com volume final em cada poço de 150µl. Os poços do controle positivo e negativo continham, respectivamente 100µl da toxina e 50µl de células, e 100µl de MEM e 50µl de células. A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera controlada (5% CO₂ e 95% O₂) por 48 horas. Após este período o sobrenadante foi descartado e lavou-se duas vezes com 100µl de PBS-1x e corados com 100µl de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do efeito citopático (ECP) (Souza Júnior, 2005). Para a leitura visual dos poços considerou-se 100% de efeito citopático (ECP) a destruição de 100% do tapete celular.

3.6. Padronização da toxina alfa nos três modelos experimentais

3.6.1. Padronização da toxina alfa em camundongo

A toxina alfa foi padronizada em camundongos empregando-se o nível de teste L+/5 (menor quantidade de toxina que, misturada com 0,2UI de antitoxina padrão homóloga e inoculada em camundongos por via endovenosa, causa morte dos animais em 72 horas), de acordo com o descrito na British Pharmacopeia (1998). Diluições

decimais da toxina em salina peptonada 1% foram homogeneizadas com antitoxina padrão homóloga e a mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Para cada diluição, 0,2ml foram inoculados em cinco camundongos por via endovenosa. Para controle negativo foi inoculado apenas 0,2ml da solução de antitoxina contendo 0,2UI. E para o controle positivo foi inoculada apenas a toxina pura 0,2ml. Os animais foram observados por 72 horas. A padronização da toxina em camundongo foi repetida cinco vezes, a fim de comprovar e validar os resultados obtidos.

3.6.2. Padronização da toxina alfa em cobaios

A toxina alfa foi padronizada em cobaios empregando-se o nível de teste L+/5 (menor quantidade de toxina que, misturada com 0,2UI de antitoxina padrão homóloga e inoculada em cobaios por via intradérmica, causa necrose na derme dos animais em 48 horas) (Knight et al., 1990a). Diluições decimais da toxina em salina peptonada 1% foram homogeneizadas com antitoxina padrão homóloga e a mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Para cada diluição, 0,2 ml, em duplicata, foram inoculados em um cobaio por via intradérmica. Para controle negativo foi inoculado, em duplicata, apenas 0,2ml da solução de antitoxina contendo 0,2UI, o controle positivo foi inoculado, em duplicata, apenas a toxina pura 0,2ml. O animal foi observado por 48 horas. A padronização da toxina em cobaio foi repetida cinco vezes, a fim de comprovar e validar os resultados obtidos.

3.6.3. Padronização da toxina alfa em célula

A toxina alfa foi padronizada na linhagem VERO empregando-se o nível de teste L+/25 (menor quantidade de toxina que, misturada a 0,04UI de antitoxina padrão homóloga causa 100% de ECP em 48 horas). Diluições seriadas na base dois da toxina foram distribuídas em placas de 96 poços, com quatro repetições para cada diluição da toxina e com volume de 50µl por poço. Foram adicionados em cada poço,

50µl de antitoxina alfa padrão homóloga, contendo 0,04UI. A placa foi homogeneizada manualmente por 30 segundos e incubada a 37°C por uma hora em estufa úmida com 5% de CO₂. Após este período foram adicionados 50µl de uma suspensão celular contendo $2,5 \times 10^4$ células e as placas reincubadas nas mesmas condições anteriores por mais 48 horas. Os poços referentes ao controle positivo (100% de destruição celular) continham 50µl de toxina, 50µl de MEM e 50µl de células. Os poços referentes ao controle negativo (100% de células viáveis) continham 100µl de MEM e 50µl de células. Os poços referentes ao controle do soro, realizado para a verificação da toxicidade do soro padrão, continham 50µl de soro padrão, 50µl de MEM e 50µl de células. O volume final em cada poço foi de 150µl. Após as 48 horas de incubação o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 100µl de PBS-1x e corados com 100µl de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do ECP (Souza Júnior, 2005). Para a leitura visual dos poços considerou-se 100% de efeito citopático (ECP) a destruição de 100% do tapete celular. A padronização da toxina em célula VERO foi repetida cinco vezes, a fim de comprovar e validar os resultados obtidos.

3.7. Teste de potência do toxóide alfa nos três modelos experimentais

3.7.1. Soroneutralização em camundongos

O “pool” de soros obtidos dos coelhos vacinados foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 56°C. Após este período, 1,0ml de diluições seriadas, na base dois, dos soros em salina peptonada 1% foram homogeneizadas com o mesmo volume da toxina padronizada ao nível de teste L+/5 em camundongo. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos. Para cada diluição, 0,2ml foram inoculados em cinco camundongos por via endovenosa. No controle negativo foi inoculado apenas 0,2ml do soro teste e no controle positivo foi inoculada apenas a toxina padronizada 0,2ml. Os animais foram observados por 72

horas (British Pharmacopeia 1998). Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão homóloga.

3.7.2. Soroneutralização em cobaios

Os soros teste foram mantidos em banho-maria a 56°C por 30 minutos e 1,0ml de diluições seriadas, na base dois, dos soros em salina peptonada 1% foram homogeneizadas com o mesmo volume da toxina padronizada ao nível de teste L+/5 em cobaio. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos e para cada diluição, em duplicata, 0,2ml foram inoculados no flanco de um cobaio por via intradérmica. No controle negativo foi inoculado, em duplicata, apenas 0,2ml do soro teste e no controle positivo foi inoculada, em duplicata, a toxina padronizada 0,2ml. Os animais foram observados por 48 horas. Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão homóloga. Foi utilizado um mesmo cobaio para a titulação de dois soros teste diferentes.

3.7.3. Soroneutralização em célula

Os soros teste foram mantidos em banho-maria a 56°C por 30 minutos e 50µl de diluições seriadas na base dois dos soros teste foram distribuídos em placas de 96 poços, com quatro repetições para cada diluição do soro e com volume de 50µl por poço. Foram adicionados em cada poço, 50µl de toxina alfa padronizada no nível de teste L+/25. A placa foi homogeneizada manualmente por 30 segundos e incubada a 37°C por uma hora em estufa úmida com 5% de CO₂. Após este período, foram adicionados 50µl de uma suspensão celular contendo $2,5 \times 10^4$ células e as placas reincubadas nas mesmas condições anteriores por mais 48 horas. Os poços referentes ao controle positivo (100% de destruição celular) continham 50 µL de toxina padronizada, 50µl de MEM e 50µl de células. Os poços referentes ao controle negativo (100% de células viáveis) continham 100µl de MEM e 50µl de células. Os poços referentes ao controle do soro,

realizado para a verificação da toxicidade dos soros teste, continham 50µl de soro teste, 50µl de MEM e 50µl de células. O volume final em cada poço foi de 150µl. Após as 48 horas de incubação o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 100µl de PBS-1x e corados com 100µl de uma solução de cristal violeta (0,1%) para observação do ECP (Souza Júnior, 2005). Para a leitura visual dos poços considerou-se 100% de efeito citopático (ECP) a destruição de 100% do tapete celular. Para a validação do teste foi realizado a retrotitulação da toxina padronizada utilizando-se a antitoxina padrão homóloga.

3.8. Análise estatística

Para a análise dos resultados empregou-se uma correlação paramétrica, através da análise estatística usando-se o quadrado de Pearson, o teste t de Student e na avaliação da distribuição normal dos dados utilizou-se o Teste de Lilliefors (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na visualização dos esfregaços da amostra de *Clostridium septicum* (ATCC 12464) corados pelo Gram, observou-se apenas a presença de bastonetes Gram positivos. Os resultados das provas bioquímicas estão apresentados na tabela 1, indicando ser a amostra *C. septicum*.

Tabela 1: Provas bioquímicas da amostra *C. septicum* ATCC 12464.

Testes bioquímicos	Amostra ATCC 12464
Fermentação da	Positivo
Fermentação da	Positivo
Fermentação da	Positivo
Reação de indol	Negativo
Urease	Negativo
Hidrólise da esculina	Positivo
Digestão de gelatina	Positivo
Lecitinase	Negativo
Lipase	Negativo

A confirmação da identidade da bactéria foi realizada através da IFD, a amostra foi corada somente pelo conjugado anti *C. septicum*, e pela PCR Multiplex através da amplificação de um segmento de 270pb, correspondente ao gene que codifica a toxina alfa de *C. septicum* (Fig. 1). A escolha dessa amostra de *C. septicum* dentre todas as presentes na bacterioteca do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa foi baseada no relato de Dias (2003), que observou um menor tempo de morte dos camundongos após inoculação de 0,2ml de sobrenadante da cultura, com título calculado de 100 DMM/ml, o mesmo valor obtido nesse experimento, quando se inoculou o sobrenadante não concentrado.

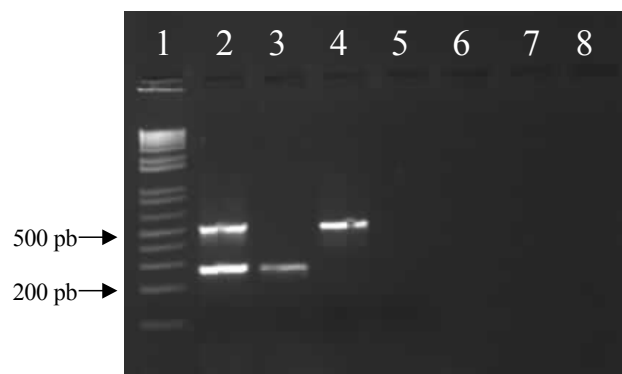


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose da PCR multiplex de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. Canaleta 1: marcador de peso molecular (1 kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Canaleta 2: amplificação de cultura pura de *C. chauvoei* (Estado de Minas Gerais) e cultura pura de *C. septicum* (ATCC 12464). Amplificação de *C. septicum* ATCC 12464 (canaleta 3) e *C. chauvoei* (canaleta 4) usando DNA genômico desses agentes separadamente. Canaleta 5: DNA genômico de *Clostridium sordellii*. Canaleta 6: DNA genômico de *Clostridium novyi* tipo A. Canaleta 7: DNA genômico de *Clostridium perfringens* tipo A. Canaleta 8: controle negativo.

A produção da toxina alfa de *C. septicum* utilizando o biorreator, demonstrou ser mais rápida, prática e segura, pois diferente da forma estática usualmente empregada, as variáveis limitantes ao processo, atmosfera de anaerobiose, temperatura e pH do meio de cultura, foram monitoradas e ajustadas para um ponto ótimo do crescimento bacteriano. A curva de crescimento de *C. septicum* está representada na figura 2. A fase *lag* foi de aproximadamente três horas e a ocorrência desta fase está principalmente relacionado a variações na padronização do inóculo e da manutenção

de condições anaeróbias do meio de cultura no início do ensaio sendo que presença de uma pequena quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura é suficiente para inibir o crescimento de *C. septicum* (Johnson, 1999). A fase *log* ou exponencial teve duração de sete horas, com o início da produção da toxina no final desta mesma fase, confirmada pela titulação do sobrenadante em camundongo. Entre a 14^a e 15^a horas de incubação observou-se o início da fase de declínio, o que determinou o final do processo da produção de toxina alfa de *C. septicum*.

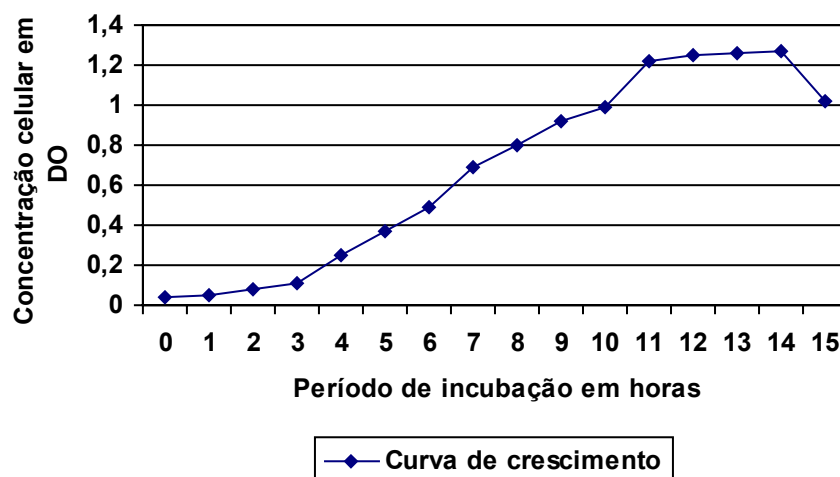


Figura 2: Concentração celular da amostra de *C. septicum* ATCC 12464, medida por densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com absorvância de 600 nm durante as 15 horas de produção da toxina alfa em biorreator.

O tempo de incubação de 15 horas foi inferior aos descritos pela literatura que variam de 18 a 28 horas (Choman, 1969; Hnátková et al., 1986; Ballard et al., 1992; Cortinãs et al., 1997; Dias, 2003). Essa redução no tempo de incubação pode ser explicada pelo uso do biorreator com controle do pH, temperatura e atmosfera de anaerobiose, além de diminuir o período de ação das proteases endógenas que degradam a toxina alfa, permitindo obter títulos maiores, agilizando o processo e otimizando as etapas subseqüentes.

A adição de um inibidor de proteases foi utilizado para evitar queda no título da toxina, pois durante as etapas de produção, centrifugação, concentração e estocagem as proteases endógenas produzidas pelo *C. septicum* atuam sobre a toxina inativando-a, como observado por vários pesquisadores (Ballard et al., 1992; Cortinãs et al., 1997; Dias, 2003).

A detecção e a tipificação da toxina foi confirmada através da metodologia descrita por Lobato (1989), uma vez que não foi observado a morte dos camundongos inoculados com a mistura de toxina e

antitoxina homóloga. Já os animais inoculados com a toxina pura vieram a óbito.

Os resultados da titulação da toxina alfa de *C. septicum* nos três modelos experimentais, camundongo, cobaio e célula, observando-se o efeito letal, dermonecrótico e citopático, respectivamente, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Titulação da toxina alfa de *Clostridium septicum* em camundongo, cobaio e célula VERO.

Modelo Experimental	Título
Camundongo	2.920 DMM/ml (Dose Mínima Mortal)
Cobaio	7.680 EDN/ml (Efeito Dermonecrótico)
Célula VERO	2.621.440 ECP/ml (Efeito Citopático)

A titulação comprovou que a entidade biológica responsável pelo efeito letal, dermonecrótico e citopático é a mesma, como demonstrado por Knigh et al. (1990).

Estes autores comprovaram em outras pesquisas que o uso de linhagens celulares para a titulação da toxina beta produzida por *Clostridium perfringens* tipo B e C não poderia ser padronizado para os mesmos fins da toxina alfa de *C. septicum*, pois a atividade biológica da toxina beta que causa a morte do camundongo e a ação dermonecrotica em cobaios é distinta daquela que causa efeito citopático em linhagem celular (Knigh et al.1990b; Souza Júnior, 2005).

Quando a toxina alfa de *C. septicum* foi titulada em camundongo observamos títulos mais altos do que os descritos na literatura como Knigh et al. (1990a) e Dias (2003), que obtiveram títulos de 1.170 DMM/ml e 2.290 DMM/ml, respectivamente. Está diferença pode estar relacionada com a forma de produção da toxina que foi realizada utilizando-se o biorreator enquanto que nos outros estudos empregou-se a forma estática. A mesma situação é observada quando comparamos os títulos obtidos em cobaio e célula, que neste experimento foram de 7.680 EDN/ml e

2.621.440 ECP/ml, respectivamente, superiores aos encontrados por Knigh et al. (1990a) de 1.580 EDN/ml e 738.000 ECP/ml.

Os títulos obtidos neste experimento demonstram que o cultivo celular foi o sistema que apresentou maior sensibilidade à toxina alfa de *C. septicum*, por detectar concentrações 900 e 340 vezes menores que o sistema camundongo e cobaio, respectivamente. Portanto a titulação da toxina alfa em linhagem celular VERO poderá ser utilizada na triagem de sementes vacinais de *C. septicum* utilizadas na produção de toxóides por laboratórios produtores de vacinas em substituição ao bioensaio em camundongos e cobaios. Além de atender aos anseios bioéticos reduzindo o número de animais empregados para este fim.

Os resultados dos títulos obtidos na padronização da toxina alfa de *C. septicum* em camundongo, cobaio e célula VERO, nos níveis de teste recomendados pela legislação, estão compilados na tabela 3.

Tabela 3: Padronização da toxina alfa de *Clostridium septicum* em camundongo (L+/5), cobaio (L+/5) e célula VERO (L+/25).

	Camundongo	Cobaio	Célula VERO
Título obtido frente ao nível de teste recomendado	200 L+/5/ml	300 L+/5/ml	5120 L+/25/ml
Volume administrado em cada modelo experimental	0,2ml	0,2ml	0,05ml
Unidades equivalentes da anti-toxina contida no volume acima	0,2UI	0,2UI	0,04UI

Os valores em unidades equivalentes da anti-toxina contida no volume administrado em camundongo e cobaio de 0,2 UI/ml está diretamente relacionado ao nível de teste aplicado nestes dois sistemas, que foi L+/5. Para o cultivo celular em que o nível de teste aplicado foi L+/25, tem-se 0,04 UI/ml, demonstrando ser menor a quantidade de anticorpo padrão utilizado na padronização da toxina alfa de *C. septicum* neste sistema indicador, representando economia na realização do teste.

Os títulos encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Knigh et al. (1990a) de 117 L+/5/ml em camundongos, 158 L+/5/ml em cobaios e 4380 L+/25/ml em cultura celular. Essa diferença encontrada pode ser explicada pelo maior título da toxina. Quando comparamos estes resultados aos obtidos por Knigh et al. (1990b) na padronização da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, em que os autores encontram títulos em camundongos de 172 L+/10/ml, em cobaios de 540 L+/25/ml e em

célula MDCK de 1600 L+/50/ml, observamos que a cultura de células é o indicador mais sensível, pois concentrações baixas de toxina são detectadas, demonstrando a real possibilidade na utilização dos modelos *in vitro* em substituição aos modelos animais na realização de teste de potência vacinal.

Para se determinar o “end point” foram observadas diversas variáveis durante os procedimentos de padronização da toxina como tempo de leitura de 24 ou 48 horas, concentrações de células de $1,5$ a 3×10^4 por poço, observação do ECP por microscopia ou coloração pelo cristal violeta e percentagem de destruição da monocamada. Nos vários ensaios realizados constatou-se que o melhor tempo de leitura do teste foi de 48 horas após incubação e a melhor concentração de células por poço foi de $2,5 \times 10^4$. Quanto ao ponto de corte, considerou-se a maior

diluição do soro onde se observava 100% de ECP na monocamada, determinado visualmente após coloração com solução de cristal violeta a 0,1%. O uso deste corante permitiu uma leitura visual rápida sem a necessidade do uso de microscópio e permitindo o armazenamento das placas por tempo indeterminado.

Os critérios adotados na padronização deste teste diferem dos empregados por Knigh et al. (1990a) que consideraram como ponto de corte 90% de ECP na monocamada, e utilizaram tempo de leitura de 72 horas. Entretanto, o número de células por poço foi o mesmo utilizado por Knigh et al. (1990a) e inferior ao utilizado por Roth et al. (1999) de 8×10^4 células por poço.

Os resultados obtidos na soroneutralização nos três sistemas utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Resultado do teste de soroneutralização em camundongo, cobaio e célula VERO mostrando o nível de anticorpos neutralizantes contra a toxina alfa de *C. septicum* em “pool” de soros de coelhos imunizados pelo teste de soroneutralização.

Soros	Modelo experimental		
	Camundongo	Cobaio	Célula
T1	2 UI/ml	2 UI/ml	1,6 UI/ml
T2	6,9 UI/ml	6,9 UI/ml	6,4 UI/ml
T3	5,76 UI/ml	5,76 UI/ml	6,4 UI/ml
T4	5,76 UI/ml	5,76 UI/ml	6,4 UI/ml
T5	2 UI/ml	2 UI/ml	1,6 UI/ml
T6	2 UI/ml	2 UI/ml	1,6 UI/ml
T7	4 UI/ml	4 UI/ml	3,2 UI/ml
T8	4 UI/ml	4 UI/ml	3,2 UI/ml
T9	2 UI/ml	2 UI/ml	1,6 UI/ml
T10 (Controle positivo)	11,52 UI/ml	11,52 UI/ml	12,8 UI/ml
T11 (Controle negativo)	Sem título	Sem título	Sem título

Utilizando o teste t de Student ($P \leq 0,05$) é possível afirmar não haver diferença estatisticamente significativa entre os títulos dos soros obtidos nos diferentes modelos testados (camundongo, cobaio e célula). E de acordo com os resultados do teste de Lilliefors verificou-se que os títulos tinham distribuição normal, o que permitiu a utilização de um método paramétrico como o

Quadrado de Pearson para estabelecimento das correlações.

Na interpretação dos dados da tabela 4 verificou-se que os valores obtidos na soroneutralização em camundongos e cobaios foram iguais para todos os soros testados. Por meio da correlação de Pearson (Fig. 3), verifica-se uma

concordância de 100% ($r = 1$) nos resultados dos bioensaios com significância menor que 5% ($P < 0,05$), superior ao encontrado por Knigth et al (1990a) de 95% ($r = 0,95$). O valor de $r = 1$ indica uma correlação perfeita e positiva entre os valores dos títulos de anticorpos obtidos na soroneutralização em camundongo e cobaios, pois os pontos estão alinhados e numa mesma direção ascendente, demonstrando que a variação de uma das variáveis (X) acompanha proporcional a variação da outra (Y). O intervalo de

confiança de r neste caso varia de um a um, significando ser a correlação entre camundongo e cobaio significativa. O valor de R^2 calculado foi igual a um indicando a ocorrência de 100% de associação entre os valores dos títulos de anticorpos nos dois modelos analisados. Estes resultados permitem afirmar que o uso de cobaios pode ser uma alternativa ao uso de camundongos, por se utilizar um número significativamente menor de animais, uma vez que num mesmo cobaio pode ser realizado o teste de duas vacinas.

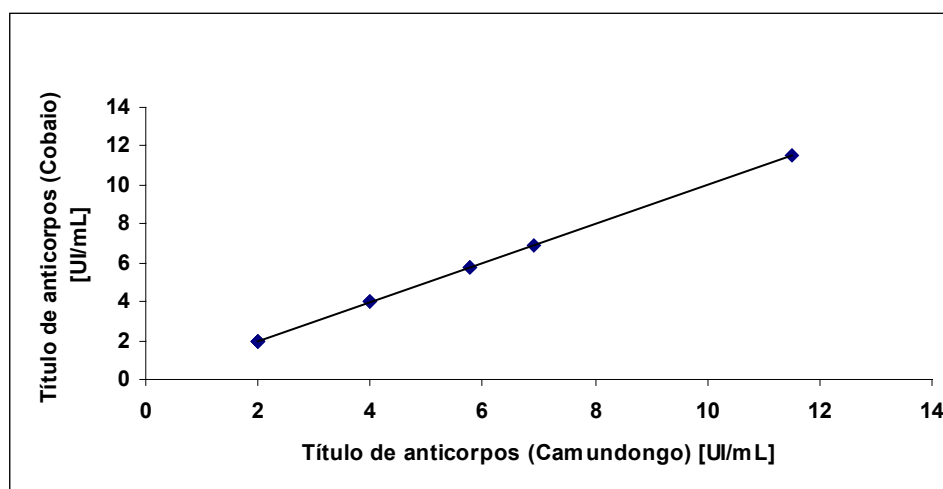


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-toxina alfa de *Clostridium septicum* em soros de coelhos obtidos por meio da técnica de soroneutralização em camundongo e cobaio, $r = 1$.

A análise do teste de potência da vacina T2, por exemplo, permite observar que os resultados de 6,9 UI/ml em camundongo e cobaio, e de 6,4 UI/ml em célula VERO, são similares indicando existir uma associação entre os títulos obtidos nos diferentes modelos experimentais, para as vacinas testadas. Através da correlação de Pearson (Fig. 4), verifica-se uma concordância de 99,12% ($r = 0,9912$) com $P < 0,05$, entre os títulos em camundongo, cobaio e célula VERO, valor superior ao encontrado por Knigth et al. (1990a) de 91%. O valor de $r = 0,9912$ também indica uma correlação perfeita e positiva entre os valores dos títulos de anticorpos obtidos na soroneutralização em animais e célula, pois os pontos estão próximos a linha imaginária

e numa mesma direção ascendente, demonstrando que a variação de uma das variáveis (X) acompanha proporcional a variação da outra (Y). O intervalo de confiança de r neste caso varia de 0,96 a um, significando ser a correlação entre os modelos *in vivo* e *in vitro* de elevada significância. O valor de R^2 calculado foi igual a 0,9824 indicando a ocorrência de 98,24% de associação entre os valores dos títulos de anticorpos nos modelos testados. Correlações significativas também foram observadas por Knigth et al. (1990b) de 91% ($r = 0,91$) e Souza Júnior (2005) de 99,73% ($r = 0,9973$) comprovando a viabilidade na substituição dos modelos *in vivo*.

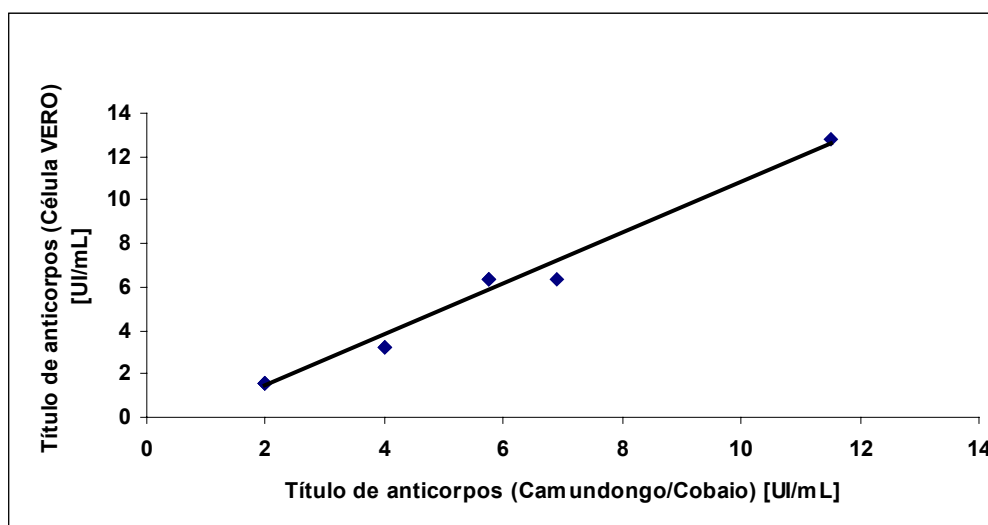


Figura 4: Correlação linear de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-toxina alfa de *Clostridium septicum* em soros de coelhos obtidos por meio da técnica de soroneutralização em camundongo/cobaio e célula, $r = 0,9912$.

O teste de soroneutralização padronizado em camundongo e cobaio permite a detecção de no mínimo 2UI/ml, enquanto o teste padronizado em célula VERO possibilita a detecção mínima de 0,8UI/ml. Esta diferença de sensibilidade na detecção de baixos títulos de anticorpos anti-toxina alfa de *C. septicum* está relacionada com o nível de teste empregado na padronização da toxina nos diferentes sistemas, que nos animais foi de L+/5 e no cultivo celular de L+/25 conforme recomendações da legislação.

O uso do cultivo celular apresenta uma série de vantagens em relação ao bioensaio animal na titulação da antitoxina alfa de *C. septicum*. Entre eles destaca-se a redução no número de animais de laboratório utilizados que atende aos anseios bioéticos; maior sensibilidade na detecção de anticorpos e toxinas; caracterização e homogeneidade do ensaio por evitar as variações nas respostas individuais; e a utilização de volumes menores de soro na realização dos testes.

Os resultados desta pesquisa em relação a soroneutralização permitiram a avaliação da eficiência das vacinas contra *C. septicum* utilizadas nas imunizações dos coelhos.

Das nove vacinas testadas, apenas cinco obtiveram títulos de anticorpos superiores ao nível mínimo exigido de 2,5 UI/ml segundo a British Pharmacopeia (1998). Estes dados corroboram com as conclusões firmadas por Dias (2003), que ao avaliar a eficiência de 12 vacinas contra *C. septicum* comercializadas no Brasil no ano de 2003, verificou que apenas cinco induziram títulos protetores, demonstrando que, em sua maioria, as vacinas são ineficientes, evidenciando a necessidade urgente da implementação de um controle efetivo deste imunógeno.

Este estudo mostrou a possibilidade de se detectar antitoxina alfa de *C. septicum*, de forma precisa, sensível, prática, rápida e sem o uso de animais. O método de soroneutralização *in vitro* em linhagem celular VERO, padronizado neste experimento, demonstrou ser uma opção viável para substituir o método *in vivo* no teste de potência de vacinas clostridiais que contenham em sua composição toxóide alfa. Os resultados demonstram alta correlação do teste *in vitro* ao teste *in vivo*, pois os valores encontrados são estatisticamente equivalentes (Tab. 4).

A utilização da soroneutralização *in vitro* na avaliação de potência de vacinas, que contém toxóide alfa de *C. septicum*, permitirá a utilização de um menor número de animais nos testes de potência de vacinas, como nos modelos indicadores de letalidade e dermonecrose. A observação da ação da toxina alfa em linhagem VERO oferece um indicador alternativo válido para titulação de antitoxina alfa.

5. CONCLUSÕES

O cultivo celular foi o sistema de maior sensibilidade à toxina alfa de *Clostridium septicum*, e pode ser utilizado na triagem de sementes vacinais utilizadas na produção de toxóides em substituição aos modelos animais.

A soroneutralização em cobaio demonstrou ser um teste viável quando comparado a soroneutralização em camundongo, podendo substituí-la na avaliação de vacinas.

O método de soroneutralização *in vitro* padronizado em linhagem celular pode ser usado como um teste alternativo ao bioensaio animal na avaliação da potência de toxóide alfa de *Clostridium septicum*.

Das vacinas contra clostridioses comercializadas no Brasil, testadas neste experimento e que continham em sua composição *Clostridium septicum*, 45,55 % foram ineficientes em induzir títulos de anticorpos compatíveis com o nível mínimo de teste recomendado pela legislação para o controle deste imunobiológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIMOTO, K. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccine against challenge with spores guinea pigs. *J. Vet. Med. Sc.*, v.64, n.1, p.67-69, 2002.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; DIAS, L.D. et al. Producción e evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Rev. Méd. Vet.*, v.82, n. 2, p.68-70, 2001.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E. et al. An outbreak of malignant edema in cattle. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, v.97, n.543, p.143-145, 2002.

ASSIS, R.A. *Mionecroses: estudos epidemiológicos e moleculares*. 2005. 70f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R. et al. Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesq. Vet. Bras.*, v.25, n.1, p.4-8, 2005.

BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E.M.B. Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos – 1970-1979, no Estado de São Paulo. *Biológico*, v.51, n.6, p.161-165, 1985.

BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D. et al. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect. Imm.*, v.60, n.3, p.784-790, 1992.

BATTY, I.; WALKER, P.D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by use of fluorescent labelled antibodies. *J. Path. Bact.*, v.85, p.517-521, 1963.

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.; CUSSLER, K. et al. Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induce 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, 192 p.

- BUXTON, D.; DONACHIE, W. C. *Clostridial Diseases*. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991. 2ed. p.104-114.
- CATO, E.P.; GEORGE, W.L.; FINEGOLD, S.M. 2.ed. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*: Genus *Clostridium*. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1986, p.1141-1182.
- CHOMAN, B.R. Sequential growth of *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* and *Clostridium novyi* in same medium. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, n.1, p.236-241, 1969.
- CONESA, L.C.G.; VANELLI, S.A.; UZAL, F.A. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. *Vet. Res. Comm.*, v.19, n.6, p.451-456, 1995.
- CORTINÃS, T.I.; MATTAR, M.A.; GUSMÁN, A.M.S. Alpha-toxin production by *Clostridium septicum* at different culture conditions. *Anaerobe*, v.3, p.199-202, 1997.
- COSTA, J.L.N.; OLIVEIRA, M.M.D.; LOBATO, F. C. F. et al. Outbreak of malignant oedema in sheep caused by *Clostridium sordellii*, predisposed by routine vaccination. *Vet. Rec.*, v.160, p.594-595, 2007.
- DIAS, L.D. *Avaliação da eficiência de vacinas contra Clostridium septicum*. 2003. 29f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- EL IDRISSE, A. H.; WARD, G. E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta e epsilon toxins. *Vet. Microb.*, v.31, n.1, p. 89-99, 1992.
- GLENNY, A. T.; LLEWELLYN, J. M.; MASON, J. H. The intracutaneous method of testing the toxin and antitoxins of the "gas gangrene" organisms. *J. Path. Bact.*, n.34, p. 201-211. 1931.
- GONZÁLEZ, A. W.; ROTH, F. Cultivos celulares como sistema diferencial de cepas de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* aisladas en el noreste de México. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 41, p. 295-301, 1999.
- GORDON, V.M.; BENZ, R.; FUJII, K. et al. *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect. Imm.*, v.65, n.10, p.4130-4134, 1997.
- HANG'OMBE, M. B.; MUKAMOTO, M.; KOHDA, T. et al. Citotoxicity of *Clostridium septicum* alpha-toxin: its oligomerization in detergent resistant membranes of mammalian cells. *Microb. Path.*, v.37, n.6, p. 279-286, 2004.
- HATHEWAY, C. L. Toxigenic *Clostridia*. *Clin. Microb. Rev.*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- HNÁTKOVÁ, Z.; VRANÝ, B.; HNÁTEK, J. et al. Preparation of *Clostridium septicum* antigen for hyperimmunization of horses using a dialyzed culture. *Folia Microb.*, v.31, n.5, p.382-386, 1986.
- JOHNSON, E. A. Anaerobic Fermentations. In: DEMAINE, A.L.; DAVIES, J.E. (Eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: ASM Press, 1999, 810p.
- KENNEDY, C.L.; KREJANY, E.O.; YOUNG, L.F. et al. The α -toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol. Microb.*, v.57, n.5, p. 1357-1366, 2005.
- 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, n.3, 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, n.4, p.263-270, 1990b.

- KUHNERT, P.; KRAMPE, M.; SELJA, E.C. et al. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Vet. Microb.*, v.57, p.291-298, 1997.
- 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. *Vet. Microb.*, v.37, p.201-219, 1993.
- LIMA, C.G.R.D.; LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M. et al. Surto de gangrena gasosa em rebanho de ovinos e caprinos. *Ciênc. Vet. Tróp.*, v.9, n.1, p.106-109, 2006.
- LOBATO, F.C.F. *Avaliação de imunógenos antituberculínicos em uso no Brasil*. 1989. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LOBATO, F.C.F.; ALMEIDA, A.C. *Clostridioses*. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.21, p. 61-69, 1997.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Diagnóstico das clostridioses e controle de qualidade das vacinas. In: Anais do V Simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos. In: Congresso Brasileiro de Buiatria. Anais do IV Congresso Brasileiro de Buiatria. Campo Grande, MS, 1999.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. *Controle e profilaxia das clostridioses*. *A Hora Vet.*, v.19, p.29-33, 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.
- MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; FATTORINI, F.R. et al. Malignant oedema associated with blood sampling in sheep. *Aust. Vet. J.*, v.80, n.5, p. 280-281. 2002.
- MOUSSA, R. S. Complexity of toxins from *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Bact.*, v.76, p.538-545, 1958.
- NAYLOR, R. D.; MARTIN, P. K.; SHARPE, R. T. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Res. Vet. Sc.*, v.42, n.1, p.255-256, 1987.
- PARREIRAS, P. M.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.*, v. 54, n. 3, p. 328–330, 2002.
- PINTO, M.P.; ABREU, V.L.V. Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti-*Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.*, v.44, p.513-520, 1992.
- 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.
- ROTH, F.; JANSEN, K.; PETZKE, S. Detection of neutralizing antibodies against α -toxin of different *Clostridium septicum* strains in cell culture. *FEMS Immunol. Med Microb.*, v.24, n.3, p.353-359, 1999.
- RUDGE, R.H. *Maintenance of microorganism: a manual of laboratory methods*. London: J. J. S. Sr ell, 1983. p.23-34.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KOJIMA, A. et al. Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *J. Vet. Med. Sc.*, v.62, p.1275-1281, 2000a.

- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KOJIMA, A. et al. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Res. Vet. Sc.*, v.69, n.3, p.289-294, 2000b.
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; AMIMOTO, K. et al. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Res. Vet. Sc.*, v.71, n.3, p.227-229, 2001.
- SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H. et al. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Vet. Microb.*, v.86, n.3, p.257-267, 2002.
- SMITH, L.D.S. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. 3.ed. Illinois: Thomas, Springfield. 1984, 550p.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microb. Rev.*, v.9, n.2, p.216-234, 1996.
- 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.; THOMSOM, A. Immunization of sheep with multi-component clostridial vaccines. *Vet. Rec.*, v.74, n.34, p.909-913, 1962.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. London: Butlerworths & CO, 1975.p.143.
- TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T. et al. Detection of *Clostridium septicum* Hemolysin Gene by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sc.*, v.59, p.853-855, 1997.
- TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUM, P.E. et al. Genus *Clostridium*: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. United Kingdom. European Concerted Action, 2006. 214p.
- TWETEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet. Microb.*, v.82, n.1, p. 1-9, 2001.
- UZAL, F. A.; HUGENHOLTZ, P.; BLACKALL, L. L. et al. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Microb.*, v.91, p.239-248, 2003.
- VANNELLI, S.A.; UZAL, F.A. *Clostridium septicum* detection by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, in formalin-fixed, paraffin embedded tissues of sheep. *Arch. Med. Vet.*, v.28, p.125-127, 1996a.
- VANNELLI, S.A.; UZAL, F.A. Identificación de *Clostridium sordellii* por una tecnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en improntas y en tejidos ovinos fijados en formol e incluídos en parafina. *Rev. Med. Vet.* v.77, p.306-312, 1996b.
- WILSON, L.; MACFARLANE, G.T. Cytotoxicity, adhesion and invasion of *Clostridium septicum* in cultured human epithelial cells (CACO-2, Hep-2): pathological significance of swarm cell differentiation. *Anaerobe*, v.2, n.2, p.71-79, 1996.
- 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, n.4, p.281-286, 1991.