

Nº 64, dezembro/2000, p.1-2

TESTE ELISA PARA DETECTAR ANTICORPOS CONTRA AS TOXINAS "C" E "D" DE *Clostridium botulinum* EM BOVINOS

Cláudio Roberto Madruga¹
Rosângela A. Queiroz²
Pedro Paulo Pires³
Sheila da Silva Moraes⁴

O botulismo foi considerado como a principal causa da mortalidade de fêmeas adultas de bovinos que ocorreu nos últimos anos na região Centro-Oeste do Brasil. Segundo estimativas dos órgãos de inspeção sanitária animal de Mato Grosso do Sul, as perdas com o rebanho bovino no Estado chegaram em torno de 35.000 matrizes entre 1986 e 1987. A imunização contra as toxinas C e D é o método preventivo mais eficiente, para evitar os prejuízos causados à pecuária bovina dessa região do país e de outras da América Latina. Entretanto, a eficiência das vacinas tem sido questionada, pois tem se verificado a ocorrência de botulismo em rebanhos imunizados com toxóides C e D.

No Brasil, não há disponibilidade de um teste sorológico para detectar anticorpos contra essas toxinas de *Clostridium botulinum*. Esse tipo de teste é útil para determinar o grau de imunidade humoral dos bovinos contra elas, pois os anticorpos são essenciais para neutralização das mesmas. Outra aplicação desse teste seria a avaliação da capacidade imunogênica das vacinas, para ser utilizado por órgãos que fiscalizam a qualidade de imunobiológicos. Entre as provas sorológicas, a imunoabsorção enzimática (ELISA) é a mais investigada devido a alta sensibilidade, especificidade e simplicidade na sua realização, quando comparada com a microfixação de complemento e a soroneutralização.

A técnica descrita é um ensaio imunoenzimático indireto para detectar anticorpos contra as toxinas C e D de *C. botulinum*. Para a padronização e desenvolvimento dos ELISAs indiretos foi realizada a produção dos antígenos C e D a partir do sobrenadante de cultura de cepas de *C. botulinum*, tipos C e D. Esse sobrenadante foi precipitado em solução hipersaturada de sulfato de amônia. Em seguida, esse material foi centrifugado e, o sedimento, ressuspenso em Tris HCl 0,1 M, pH 7,5. A concentração dos antígenos C e D foi determinada pela dosagem de proteínas totais de acordo com a técnica descrita por Lowry et al. (1951). Na execução do teste ELISA indireto, utilizou-se a microplaca de poliestireno de 96 orifícios da marca Nunc, com os antígenos C e D, respectivamente, na concentração de 2,4 microgramas/mililitro e 0,36 micrograma/mililitro. Após o período de incubação, a microplaca foi congelada à -20°C ou usada imediatamente no teste. Realizou-se o bloqueio com soro equino a 1% livre de IgG, diluído em

¹ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0587, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: madruga@cnpqg.embrapa.br

² Mestranda em Biologia Parasitária, Fundação Instituto Oswaldo Cruz/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FIOCRUZ/UFMS), Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ.

³ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0875, Embrapa Gado de Corte.

⁴ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 1038, Embrapa Gado de Corte.

tampão fosfato pH 7,2, acrescido de 0,1% de Tween 20. Os soros-teste e os controles negativos e positivos foram diluídos a 1:500 e 1:1000, respectivamente para os ELISAs indiretos, utilizando os antígenos C e D. O conjugado usado foi o anti-IgG de bovino ligado à peroxidase, na diluição de 1:3.000 com antígeno C e, 1:8.000, com o D. Os substratos empregados foram o ácido 5-aminosalicílico (5-AS) e o ortofenil diamina (OPD), respectivamente, nos ELISAs indiretos, para detectar anticorpos contra as toxinas C e D. A linha de corte, que define até que valor de densidade ótica (DO) os soros são negativos, foi determinada com soros de animais comprovadamente negativos. A especificidade dos testes ELISAs indiretos foi verificada por meio da análise de 32 soros, obtidos de bovinos criados na área de isolamento do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte). A sensibilidade dos testes foi avaliada pela análise dos soros de bovinos imunizados contra botulismo. Após a determinação da sensibilidade e especificidade, a resposta imune humoral de dois grupos de bovinos vacinados foi avaliada, respectivamente, com vacinas comerciais, denominadas, experimentalmente, como G e R.

A análise dos 32 soros dos bovinos mantidos em área de isolamento demonstrou que nenhum foi positivo nos ELISAs indiretos. A especificidade do teste é elevada, porque apenas um soro foi negativo no ELISA indireto com o antígeno C. Esse parâmetro de desempenho do teste ELISA para diagnóstico de anticorpos contra a toxina D também foi elevado, porque apenas dois soros foram negativos. A média da DO dos soros dos animais vacinados demonstrou que a vacina R é mais imunogênica, pois DOs mais elevadas foram observadas em bovinos que receberam essa vacina. Além disso, as DOs verificadas após revacinação foram mais elevadas com os soros dos bovinos vacinados com a R do que com os daqueles vacinados com a G.

Os resultados dos ELISAs indiretos demonstraram que essas provas sorológicas podem ser utilizadas pelo serviço de vigilância sanitária e permitirão uma avaliação e controle da eficiência de imunobiológicos usados como vacinas contra as toxinas C e D de *Clostridium botulinum*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemical*, v.193, p.265-275, 1951.

Tiragem: 100 exemplares