

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO D¹

DEISE A. OLIVEIRA SILVA², MARIA A. SOUSA², ÂNGELA M. A. HENARES BEICHER³, JOSÉ ROBERTO MINEO², FERNANDO A. FERREIRA⁴, HUMBERTO E. COELHO⁴ e JOSÉ EUGÊNIO D. BASTOS⁴

ABSTRACT. – Silva D.A.O., Souza M.A., Beicher A.M.A.H., Mineo J.R., Ferreira F.A., Coelho H.E. & Bastos J.E.D. 1991. [Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of botulinum type D Toxin.] Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da toxina botulínica tipo D. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):13-16. Depto Ciências Fundamentais Saúde, Univ. Fed. Uberlândia, Cx. Postal 593, Uberlândia, MG 38400, Brazil.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection of botulinum type D toxin. The double antibody sandwich ELISA was performed with reference to botulinum type D antitoxin (Statens Serum Institut, Denmark) as in the solid phase, to sensitize plastic surface, as in the production of the immunoenzymatic conjugate. The sensitivity of ELISA was evaluated by using various dilutions of botulinum type D toxin added to liquid culture or a pool of normal bovine serum. The reactivity was, respectively, 15.6 LD₅₀/ml and 31.2 LD₅₀/ml for mice, with absorbance measured spectrophotometrically at 450 nm using an ELISA microreader. The specificity was demonstrated by the absence of reactivity with botulinum type A, B and E, tetanic and diphtheric toxins. However, botulinum type C toxin indicated a partial cross-reactivity due to comparable common antigenic determinants between type C and D toxins. Considering the results presented in this paper it can be concluded that the assay is particularly useful as a sensitive, fast and efficient screening method for detection of botulinum type D toxin, but it has the same limitations for the direct diagnosis of botulism in cattle as encountered with the bioassay in mice, because of the low concentration of circulating toxin.

INDEX TERMS: Botulism, serologic diagnostic, ELISA.

SINOPSE. – Foi desenvolvido um teste imunoenzimático (ELISA) capaz de detectar toxina botulínica tipo D. A técnica empregada foi a de Duplo Anticorpo (ELISA "Sandwich") utilizando-se antitoxinas botulínicas tipo D de referência (Statens Serum Institut, Dinamarca) tanto na fase de sensibilização das micropilacas de polivinilcloreto como para a produção do conjugado imunoenzimático (antisoro botulínico tipo D ligado à peroxidase). A sensibilidade do teste foi verificada através de titulações de toxina botulínica tipo D em fluidos de cultura e adicionada a "pool" de soro bovino normal, resultando em reatividade correspondendo respectivamente a 15,6 DL₅₀/ml e 31,2 DL₅₀/ml para camundongos, determinada espectrofotometricamente em leitor de micropilacas. A especificidade, por sua vez, foi demonstrada pela ausência de reatividade com os diferentes tipos de toxinas botulínicas A, B e E, toxinas tetânica e diftérica. Entretanto, foi observado reatividade cruzada parcial com a toxina botulínica tipo C, devido às semelhanças antigênicas entre as toxinas tipos C e D. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o referido teste pode ser utilizado como um método de triagem, sensível, rápido e eficaz para a detecção de toxina botulínica tipo D, em-

bora, especificamente para o diagnóstico direto do botulismo do bovino, o método tem as mesmas limitações do bioensaio em camundongos por causa da baixa concentração de toxina circulante.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Botulismo, diagnóstico sorológico, ELISA.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma neuroparalisia causada pela ação de toxinas de natureza proteica produzidas por *Clostridium botulinum*, afetando não somente os seres humanos como também várias outras espécies de mamíferos, aves e peixes (Tokarnia et al. 1970, Schonhofen & Garcia 1981, Delazari & D'Avila 1983, Kelly et al. 1984, Schocken et al. 1985).

Há 8 tipos de toxinas imunologicamente distintas: A, B, C₁, C₂, D, E, F e G (Boroff & Das Gupta 1971). Os casos humanos estão geralmente associados aos tipos A, B e E. As toxinas C e D estão comumente associadas ao botulismo animal (Delazari & D'Avila 1983).

No Brasil, os surtos se concentram no gado bovino, principalmente nas regiões de cerrado, tendo sido tipificadas as toxinas botulínicas C e D (Tokarnia et al. 1970, Delazari & D'Avila 1983).

A prova mais convincente no diagnóstico laboratorial

¹ Aceito para publicação em 2 de maio de 1989.

² Laboratório de Imunologia, ³ Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Fundamentais para a Saúde, e ⁴ Departamento de Medicina Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Caixa Postal 593, Uberlândia, MG 38400.

do botulismo baseia-se na detecção da toxina botulínica no soro e em outras amostras biológicas do organismo infectado. Uma das modalidades técnicas para esta detecção consiste de um bioensaio em camundongos, através de soroneutralização da toxina com antisoros específicos (Smith 1977). Este teste mostra-se bastante sensível, permitindo a detecção de níveis de toxina menores que 5 DL₅₀/ml em amostras biológicas (Shone et al. 1985). Entretanto, apresenta alguns inconvenientes, como a utilização de grande número de animais de laboratório, demora para obtenção dos resultados, morte inespecífica devido à interferência de outras substâncias que podem ser letais ou influenciar na neutralização das toxinas (Dezfulian & Bartlett 1984).

Recentemente, têm sido desenvolvidos métodos imunológicos "in vitro" para facilitar a identificação dos diferentes tipos de toxinas produzidas por *Cl. botulinum*. Entre eles incluem hemaglutinação (Evancho et al. 1973, Sakaguchi et al. 1974), radioimunoensaio (Boroff & Das Gupta 1971, Ashton et al. 1985) e ELISA (Kosaki et al. 1979, Notermans et al. 1982b, Michalik et al. 1986).

O teste ELISA, apesar da menor sensibilidade que o bioensaio em camundongos, tem apresentado vantagens como técnica alternativa relativamente rápida e realizável, permitindo detectar toxinas mesmo em estado toxicologicamente inativo (Kozaki et al. 1979).

No presente trabalho, o teste ELISA foi padronizado para a detecção de toxina botulínica tipo D em filtrado de cultura e adicionada a amostras de soro bovino normal com finalidade de se utilizar esta técnica para detecção da toxina.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxinas

As preparações de toxinas botulínicas tipos C e D foram obtidas, respectivamente, de culturas de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D, provenientes do Laboratório Vallée Nordeste S/A., em meio de Wright por 5 dias a 30°C (Wright 1933). As preparações de toxinas botulínicas tipos A, B e E e toxinas tetânica e diftérica foram fornecidas pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP. A potência da toxina botulínica tipo A era de 8 x 10⁴ DL₅₀/ml e a toxina diftérica continha 120 Lf/ml.

Antitoxinas

As antitoxinas botulínicas tipo D (1000UI/ml) produzidas em eqüinos foram obtidas do "Statens Seruminstitut" de Copenhague, Dinamarca. A concentração protéica destes antisoros foi realizada pelo método de Lowry et al. 1951, empregando-se como padrão a albumina humana (Behring 20%) sendo a leitura efetuada em colorímetro Coleman Jr. no comprimento de onda de 660nm.

Conjugado imunoenzimático

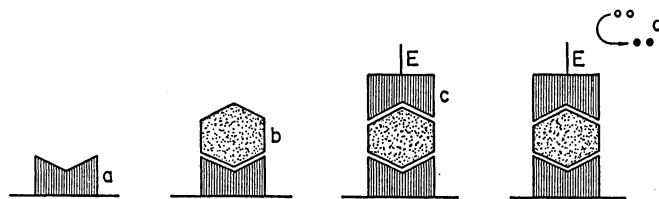
O antisoro botulínico tipo D (Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca) foi ligado quimicamente à enzima peroxidase (Sigma Ch. Co, type VI) segundo o método de Nakane & Kawaoi (1974). O conjugado assim obtido foi adicionado de glicerina neutra (E. Merck, Darmstadt), alíquotado e estocado a -20°C.

Determinação da atividade enzimática

O substrato utilizado para revelar a atividade enzimática consistiu de uma solução de peróxido de hidrogênio (0,3%) em Tampão Citrato-Fosfato 0,075M, pH = 4,0 contendo Tetrametilbenzidina (TMB) na concentração de 10mg/1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Ensaio imunoenzimático

A técnica empregada para a detecção da toxina botulínica foi a descrita por Notermans et al. (1982b), com modificações como esquematizada na Fig. 1.



- a - λ -eqüina antitoxina D.
 b - toxina botulínica tipo D.
 c - λ -eqüina antitoxina D marcada com a enzima peroxidase (E)
 d - substrato

Fig. 1. Esquema da técnica imunoenzimática (Elisa) de duplo anticorpo.

Microplacas de polivinilcloreto com fundo em U (Hemobag, Campinas, SP) foram sensibilizadas com 100 μ l de antitoxina botulínica tipo D a uma concentração protéica de 20 μ g/ml, diluída em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,06M, pH = 9,6. Como controle, foi utilizada gama-globulina eqüina não imune, nas mesmas condições.

Após incubação por uma noite a 4°C, as microplacas foram submetidas a lavagens por três vezes com salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH = 7,2, contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Em seguida, foram adicionados 100 μ l de diferentes diluições de amostras padrão positiva e negativa.

As amostras padrão positiva consistiram de filtrados de cultura contendo toxina botulínica tipo D diluída em PBS adicionado de gelatina a 0,2% (PBS-G) e de "pool" de soro bovino normal adicionado de diferentes diluições do filtrado de cultura. As amostras padrão negativa consistiram dos mesmos diluentes (PBS-G e soro bovino normal) sem a adição de toxina tipo D.

Após incubação por 45 minutos a 37°C, as placas foram submetidas a novas lavagens como anteriormente descrito e incubadas nas mesmas condições com 100 μ l de antitoxina botulínica tipo D marcada com peroxidase, na diluição de 1/500 em PBS-T.

O excesso do conjugado foi removido por lavagens e adicionando-se em seguida 100 μ l da solução do substrato enzimático. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, sob agitação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ l de solução 2N de H₂SO₄. Os valores de absorbância foram determinados a 450nm em leitor de microplacas (Sanko, Belo Horizonte, MG).

Os valores de absorbância líquida foram calculados pela diferença entre os dois valores obtidos nas cavidades das microplacas sensibilizadas com a antitoxina botulínica e com a gama-globulina eqüina não-imune (controle).

Determinação da sensibilidade

Para a determinação da sensibilidade da técnica imunoenzimática, as amostras padrão positiva foram tituladas, na razão 2, a partir de 1000 DL₅₀/ml até 1,9 DL₅₀/ml, sendo diluídas em PBS-G e adicionadas a "pool" de soro bovino normal.

Determinação da especificidade

A especificidade da técnica foi determinada utilizando-se filtrados de cultura de toxinas botulínicas tipos A, B, C e E, toxinas tetânica e diftérica.

Bioensaio em camundongos

A potência das toxinas botulínicas tipos C e D fora determinadas mediante a inoculação do filtrado de cultura em camundongos, segundo Notermans et al. (1982a), determinando-se a DL₅₀ pelo método de Reed & Muench (1938).

RESULTADOS

A potência das toxinas botulínicas tipos C e D foi, respectivamente, $1,4 \times 10^4$ DL₅₀/ml e 4×10^4 DL₅₀/ml, determinada após inoculação intraperitoneal em camundongos.

Nas Figuras 2 e 3, está representada a comparação entre ELISA e Bioensaio em camundongos para a detecção de toxina botulínica. O menor nível de detecção pelo ELISA correspondeu a 15,6 DL₅₀/ml quando a toxina foi titulada em filtrado de cultura (Fig. 2) e a 31,2 DL₅₀/ml quando adicionada a "pool" de soro bovino normal (Fig. 3).

Quanto à especificidade, nenhuma reação cruzada foi observada com amostras de toxinas botulínicas tipos A, B

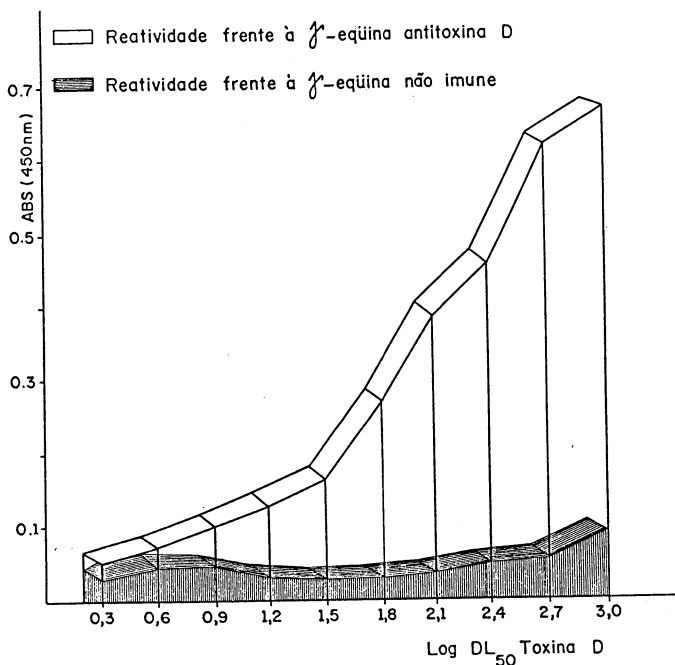


Fig. 2. Determinação da sensibilidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D em filtrado de cultura.

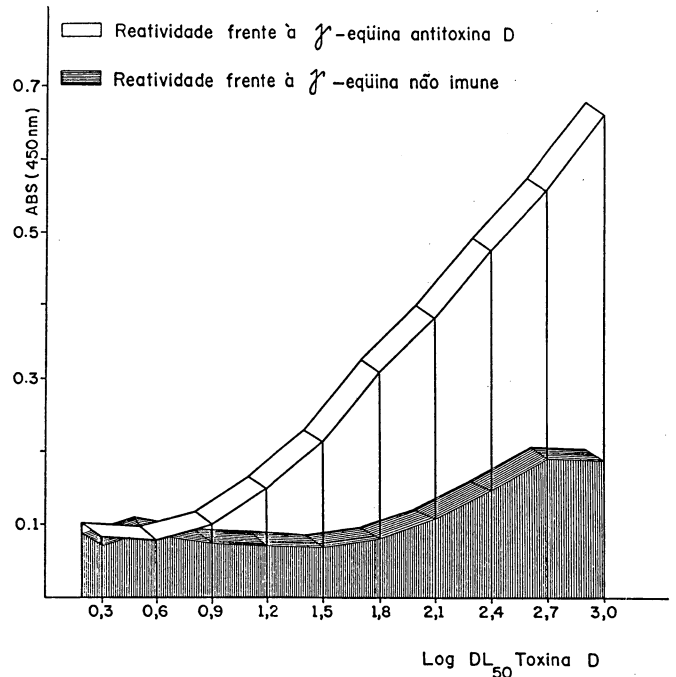


Fig. 3. Determinação da sensibilidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D adicionada a soro bovino normal.

Quadro 1. Determinação da especificidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção da toxina botulínica tipo D com amostras de diferentes tipos de toxinas botulínicas, toxinas tetânica e diftérica

Amostras	Toxicidade	ELISA (Valores de absorvância a 450nm)
Toxina botulínica tipo A	8×10^4 DL ₅₀ /ml	.000
Toxina botulínica tipo B	ND ^a	.000
Toxina botulínica tipo C	$1,4 \times 10^4$ DL ₅₀ /ml	.231
Toxina botulínica tipo D	4×10^4 DL ₅₀ /ml	.567
Toxina botulínica tipo E	ND	.000
Toxina tetânica	ND	.000
Toxina diftérica	120 Lf/ml	.000

^aND = não determinada.

e E, toxinas tetânica e diftérica. Entretanto, como demonstrado no Quadro 1, observou-se uma reatividade cruzada parcial com a toxina botulínica tipo C.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados, torna-se evidente que a toxina botulínica tipo D pode ser detectada pelo ELISA, tanto em fluido de cultura como quando adicionada a soro bovino normal. É um teste relativamente simples, rápido, não requerendo animais de laboratório nem tampouco ativação tríplica das amostras.

Usando-se a técnica de "sandwich", o nível de detecção de toxina botulínica em filtrado de cultura correspondeu a 15,6 DL₅₀/ml com uma sensibilidade superior à descrita na literatura (Notermans et al. 1982a). Quando adicionada a soro bovino normal, a sensibilidade foi de 31,2 DL₅₀/ml, tornando-se possível a detecção da toxina botulínica em amostras de soro bovino com suspeita clínica de botulismo, sem fatores interferentes.

Nenhuma reação cruzada foi observada com as toxinas botulínicas dos tipos A, B e E, assim como outras toxinas testadas. Entretanto, foi observado reação cruzada com a toxina botulínica tipo C, também verificada por Notermans et al. (1982a). Tal fato pode ser atribuído a que uma mesma cepa de *Clostridium botulinum* pode produzir os dois tipos de toxinas C e D em diferentes concentrações (Ochanda et al. 1984, Oguma et al. 1984) e estas apresentarem determinantes antigênicos em comum (Oguma et al. 1980).

Sendo assim, a diferenciação de toxinas botulínicas tipos C e D em testes imunológicos "in vitro" é dificultada em virtude da complexidade e semelhança antigênica das toxinas produzidas por *Cl. botulinum*.

A especificidade do teste ELISA está altamente relacionada com o antisoro botulínico utilizado (Notermans et al. 1978). Michalik et al. (1986) observaram que antitoxinas botulínicas comerciais contêm anticorpos dirigidos contra vários epítópos, resultando em forte reatividade cruzada entre as toxinas botulínicas tipos A e B, para o teste ELISA. Embora tenham sido empregadas antitoxinas botulínicas de referência (Statens Seruminstitut, Dinamarca) no teste ELISA para detecção de toxina botulínica tipo D, foi observado reatividade cruzada com a toxina botulínica tipo C.

Apesar da confirmação de que a diferenciação entre toxinas botulínicas tipos C e D pelo ELISA foi parcial (Notermans et al. 1982a) isto poderia ser solucionado pela purificação das antitoxinas utilizadas levando a um aumento da especificidade do teste.

Sabe-se que o diagnóstico direto do botulismo em bovinos, baseado na detecção da toxina botulínica, é dificultado devido à baixa concentração da toxina circulante, a não ser em casos superagudos, inclusive pelo clássico bioensaio em camundongos (Langenegger et al. 1987). Desta forma, como método adicional na elucidação do botulismo, o ensaio imunoenzimático descrito poderia ser testado quanto à aplicação para detectar toxina botulínica tipo D em diferentes amostras provenientes de animais com suspeita clínica de botulismo, bem como em filtrados de cultura obtidos das referidas amostras e prováveis fontes de contaminação.

REFERÊNCIAS

- Ashton A.C., Erowther J.S. & Dolly J.O. 1985. A sensitive and useful radioimmunoassay for neurotoxin and its haemagglutinin complex from *C. botulinum*. *Toxicon* 23(2):235-246.
- Boroff D.A. & Das Gupta B.R. 1971. Botulinum toxin, p. 1-68. In: Kadis S., Montie T.C. & Ajil S.J. (ed.) *Microbiol Toxins*, Vol. 2A. Academic Press, New York.
- Delazari I. & D'Avila Z.S. 1983. Botulismo: ocorrência, diagnóstico e medidas terapêuticas. *Higiene Alimentar* 2(3):132-149.
- Dezfulian M. & Bartlett J.G. 1984. Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunological tolerant animals. *J. Clin. Microbiol.*, 19(5):645-648.
- Evancho G.M., Ashton D.H., Briskey E.J. & Schantz E.J. 1973. A standardized reversed passive hemagglutination technique for the determination of botulinum toxin. *J. Food. Sci.* 38:764-767.
- Kelly A.P., Jones R.T., Gillick J.C. & Sims L.D. 1984. Outbreak of botulism in horses. *Equine Vet. J.* 16(6):519-521.
- Kozaki S., Dufrenne J., Hagenars A.M. & Notermans S. 1979. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Clostridium botulinum* type B toxin. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 32:199-205.
- Langenegger J., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1987. Botulismo epizootico em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 7(1):vii-ix.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Michalik M., Grzybowski J., Ligieja J. & Reiss J. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and differentiation of *Clostridium botulinum* toxins type A and B. *J. Immunol. Methods* 93:225-230.
- Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem.* 22:1084-1091.
- Notermans S., Dufrenne J. & Shothorst M. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* toxin type A. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 31:81-85.
- Notermans S., Dufrenne J. & Kozaki S. 1982a. The relation between toxicity and toxin-related antigen contents of *Clostridium botulinum* types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35:203-211.
- Notermans S., Hagenars A.M. & Kozaki S. 1982b. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and determination of *Clostridium botulinum* toxins A, B and E. *Methods in Enzymology* 84:223-239.
- Ochanda J., Syuto B., Oguma K., Iida H. & Kubo S. 1984. Comparison of antigenicity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(6):1319-1322.
- Oguma K., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1980. Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Infect. Immun.* 30:656-660.
- Oguma K., Muryama S., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1984. Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C₁, and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43(2):584-588.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S. & Ohishi I. 1974. Cross reaction in reversed passive hemagglutination between *Clostridium botulinum* type A and B toxins and its avoidance by use of antitoxic component immunoglobulin isolated by affinity chromatography. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 27:161-172.
- Schocken R.P.I., Ávila F.A., Pinese J.R. & Yokoya F. 1985. An outbreak of type C botulism in broiler chickens in São Paulo State, Brazil. *Revta Microbiol., S. Paulo*, 16(1):31-35.
- Schonhofen C.A. & Garcia R.G.F. 1981. First outbreaks of botulism in wild ducks in Curitiba, PR. *Arq. Biol. Tecnol., Curitiba*, 24(4):433-435.
- Shone C., Smith P.W., Appleton N., Hambleton P., Modi N., Gatley S. & Melling J. 1985. Monoclonal antibodies-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(1):63-67.
- Smith L.D. 1977. Botulismo. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acribia, Zaragoza (Espanã), p. 62-80.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 5:465-472.
- Wright H.D. 1933. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for pneumococcus and other organisms. *J. Path. Bact.* 37:257.