

## **Produção de anticorpos monoclonais contra a neurotoxina produzida pelo**

### ***Clostridium botulinum* tipo D**

TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO<sup>1</sup>, HENRIQUE LANZA<sup>2</sup>, MARIA APARECIDA  
DE SOUZA<sup>3</sup>

As neurotoxinas produzidas por *Clostridium botulinum* (BoNT sorotipos de A - G), são as proteínas bacterianas de maior letalidade conhecidas até hoje. O desenvolvimento de ferramentas biológicas para a toxina é de valiosa importância no esclarecimento da doença. No presente trabalho foram produzidos quatro anticorpos monoclonais contra a toxina botulínica tipo D, todos do isotipo IgG3. Estes anticorpos (1H10, 1F7, 2A1, 2H8) apresentaram reatividade específica à toxina botulínica tipo D, pelo teste ELISA. No entanto, apenas o anticorpo 2E8, foi capaz de reconhecer a cadeia total da toxina, com peso molecular aparente de 150 kDa, após o tratamento com ácido tricloroacético (TCA) e análise por Western blotting. Os demais anticorpos monoclonais, provavelmente, reconheceram epitopos conformacionais da cadeia total da toxina. Deste modo, estes anticorpos poderão ser utilizados na pesquisa da toxina inatura, em fluidos de cultura e/ou amostras biológicas de animais com suspeita clínica de botulismo.

<sup>1</sup>Aluno bolsista CNPq/UFU, Iniciação Científica, Curso de Medicina Veterinária; <sup>2</sup>Aluno do Curso de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; <sup>3</sup>Orientadora - Instituto de Ciências Biomédicas - ICBIM - Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia - DEIMP; Disciplina de Imunologia, Bloco 4C - Campus Umuarama - Universidade Federal de Uberlândia/Uberlândia - MG; e-mail: masouza@ufu.br



**Production of monoclonal antibodies against *Clostridium botulinum* type D neurotoxin**

TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO<sup>1</sup>, HENRIQUE LANZA<sup>2</sup>, MARIA APARECIDA DE SOUZA<sup>3</sup>

The neurotoxins produced by *Clostridium botulinum* (BoNT serotypes A-G), are bacterial proteins that have the superior lethality discovered to date. The development of biological tools against this toxin is of great importance in the understanding of the disease. In the present study, we produced four monoclonal antibodies against the botulinic toxin type D, which all have isotypes IgG3. These antibodies (1H10, 1F7, 2<sup>A</sup>1, 2H8) presented specific reactivity to botulinic toxin type D by ELISA. However, only the antibody 2H8 was capable of recognizing the toxin's full chain, with the perceptible molecular weight of 150 kDa, after treatment with trichloroacetic acid (TCA) and analyzed by Western blotting. The remaining monoclonal antibodies, probably recognized conformational epitopes of the toxin's whole chain. Therefore, these antibodies may be used in the diagnosis for the presence of toxin, as in culture fluids and/or biological samples of animals with clinical suspicion of botulism.

<sup>1</sup>Aluno bolsista CNPq/UFU, Iniciação Científica, Curso de Medicina Veterinária; <sup>2</sup>Aluno do Curso de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; <sup>3</sup>Orientadora - Instituto de Ciências Biomédicas - ICBIM - Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia - DEIMP; Disciplina de Imunologia, Bloco 4C - Campus Umuarama - Universidade Federal de Uberlândia/Uberlândia - MG; e-mail: masouza@ufu.br

## INTRODUÇÃO

As neurotoxinas botulínicas, em sua forma ativa, são proteínas constituídas por duas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 100.000 e 50.000 Da ligadas por uma ponte de dissulfeto, revisado por DasGUPTA (1989). Elas são sintetizadas como cadeias simples e com baixa atividade biológica, requerendo clivagem por enzimas proteolíticas para formar a molécula de cadeia dupla, altamente ativa (MIDURA, 1996).

Todas as neurotoxinas dos tipos A a F, possuem a habilidade para produzir lipases que podem ser detectadas como um filme iridescente ao redor da colônia em crescimento em meio agar-gema de ovo (MIDURA, 1996).

A toxina botulínica é o mais potente veneno, em seres humanos, apresentam

uma dose letal estimada em  $1 \times 10^{-9}$  mg/kg (CECIL, 1997). As toxinas botulínicas são disseminadas por via hematogênica para as sinapses colinérgicas, onde podem ligar-se de modo irreversível e bloquear a liberação de acetilcolina. O resultado desse evento é uma hipotonia com paralisia flácida decrescente no organismo contaminado.

A toxina tem afinidade para receptores em terminações nervosas e funções neuromusculares que estimulam a contração muscular. Após a toxina ligar ao receptor, uma porção da molécula penetra na célula nervosa e bloqueia a liberação de neuro-transmissores. O fragmento tóxico age como uma endopeptidase dependente de zinco que cliva uma das diversas proteínas do sistema neurotransmissor (MONTECUCCO & SCHIAVO, 1994).

A toxina se liga irreversivelmente ao terminal neural da junção neuromotora,

onde ela sofre endocitose. Após a entrada, ela impede a liberação de acetilcolina mediada por cálcio. O bloqueio neuromuscular segue como resultado levando à destruição da placa motora terminal. Entretanto, a toxina não atravessa a barreira hematoencefálica (EDWARDS *et al.*, 1997).

As toxinas botulínicas tipos C e D são descritas como causadoras de botulismo em animais domésticos, incluindo bovinos, carneiros, cavalos, porcos, cães e muitas espécies de aves, devido a ingestão da toxina pré-formada, nas mais variadas partes do mundo (MAIN & GREGORY, 1996; CHAMBERLAIN & THOMAS, 1995). A doença causada pelas toxinas de *C. botulinum*, leva a grandes perdas econômicas, tanto na criação de bovinos assim como na indústria (TRUEMAN *et al.*, 1992). Os surtos em bovinos, estão relacionados geralmente à deficiência de

fósforo nas pastagens e alimentação, com conseqüente osteofagia e o hábito de ingerir restos de cadáveres contendo a toxina botulínica (DÖBEREINER *et al.*, 1992).

Em alguns tipos de aves, há também ocorrência de botulismo, pelo fato de ingerir restos de animais em putrefação contendo a toxina pré-formada (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1985).

Em eqüinos, a contaminação deve-se principalmente pela ingestão de silagem contaminada com a toxina (KELLY *et al.*, 1984).

O Diagnóstico do botulismo se baseia na detecção da toxina em amostras biológicas, tais como: fezes, enema, conteúdo estomacal, soro, secções intestinais de autopsia, oriundas de indivíduos ou animais com sintomatologia clínica da doença.

O bioensaio em camundongos é usado como teste de referência para demonstrar a presença de toxina na amostra, isto é, a substância capaz de ser tóxica para o camundongo, que é inativada após fervura por 10 minutos (não é usada para amostras de soro) e neutralizada por uma anti-toxina botulínica monovalente, de referência (CDC), pelo teste de neutralização em camundongo (DOWELL & HAWKINS, 1974). Embora, outros métodos sorológicos, tais como: ELISA (SILVA *et al.*, 1991; THOMAS, 1991), e de Biologia Molecular, PCR (SZABO *et al.*, 1994), Bioensaio “in vitro” (WICTOME, 1999) têm sido propostos para a detecção de toxina botulínica em amostras biológicas; reagentes para esses procedimentos não estão disponíveis em todos os laboratórios ou não houveram avaliações inter-laboratoriais para aplicação desses reagentes. Desse modo, o

bioensaio (teste de soroneutralização) em camundongos ainda permanece como o teste de maior confiabilidade no diagnóstico definitivo do botulismo.

O diagnóstico do botulismo ainda é um grande desafio. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de anticorpos monoclonais contra a toxina botulínica tipo D, reagentes de alta especificidade, e desse modo, contribuir para o esclarecimento dessa grave enfermidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção da toxina botulínica tipo D:*

A toxina produzida pelo *Clostridium botulinum* tipo D, foi gentilmente cedida pelo Instituto Vallé Nordeste S/A - Montes Claros - MG. A toxina obtida foi semi-purificada por precipitação com sulfato de amônia a 40% e dialisada contra salina tamponada com fosfatos (PBS) por 48

horas a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A toxicidade foi determinada pela inoculação em camundongos e, o perfil da toxina, analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 7%, utilizando o método de coloração pela prata para visualização das proteínas.

#### ***Imunização de camundongos.***

Camundongos BALB/c foram imunizados com a toxina tipo D inativada pelo formol a 0,5% em PBS, por 60 minutos a 37°C, com quatro doses de 50 µg/ml, por via subcutânea em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose contendo adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., USA) e as doses subsequentes com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e, avaliados quanto a produção de anticorpos contra a toxina tipo D, pelo método de

ELISA. Ao final da imunização dos animais que apresentaram maiores níveis de anticorpos, coletou-se os baços para serem utilizados no processo de fusão celular.

***Ensaio imunoenzimático ELISA:*** Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning) foram sensibilizadas com 10 µg/ml de toxina botulínica tipo D, diluída em tampão carbonato/ bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Em seguida, amostras de soro dos camundongos imunizados e não imunizados, bem como, oportunamente, sobrendantes de hibridomas foram adicionados às placas (50µl/poço) e, incubadas por 45 minutos a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionado o conjugado imunoenzimático [IgG de cabra anti-IgG de camundongo ligado à peroxidase (Sigma)] e incubado a 37°C por 45 minutos. A ligação específica foi revelada pela adição de substrato enzimático [peróxido de

hidrogênio a 0,03%, diluído em tampão citrato, pH 5, contendo 0,001 M do cromógeno o-fenilenodiamino (Sigma)]. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 2 N e, efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA).

**Western Blotting:** Após a migração da toxina por eletroforese (SDS-PAGE, 7%), foi realizada a eletrotransferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (NC, Sigma) 0,45 µm de porosidade, de acordo com as técnicas descritas por TOWBIN *et al.* (1979) e BURNET (1981), com algumas modificações. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foram cortadas em tiras, que após bloqueadas, foram incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação horizontal lenta, com as amostras de soro dos camundongos imunizados ou não, ou ainda, com os sobrenadantes dos

hibridomas oriundos da fusão celular, que apresentaram reatividade pelo teste de ELISA com a toxina. Em seguida, foi adicionado o conjugado imuno-enzimático [IgG de Cabra anti - IgG de camundongo ligado à peroxidase (Sigma)] e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagens em PBS, a reatividade específica foi determinada pela adição de substrato enzimático [peróxido de hidrogênio a 0,03%, diluído em PBS, contendo 0,01M de diaminobenzidina - DAB (Sigma)]. A reação foi interrompida por lavagens em água corrente. O perfil de proteínas foi analisado frente aos padrões de peso molecular (Sigma).

***Produção de anticorpos monoclonais:***

Os animais que apresentaram maiores níveis de anticorpos, foram utilizados para fusão celular, para a produção de anticorpos monoclonais. Células do mieloma SP2O/Ag14 (ATCC - USA)

foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco (Sigma) contendo 100 µg/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina e 10 µg/ml de anfotericina B (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB (Cutilab Mat Cult Cel Ltda, Campinas, SP). A fusão celular foi realizada com as células esplênicas, obtidas de camundongos BALB/c imunizados com a toxina tipo D, e células do mieloma (SP2O/Ag14) na presença de polietilenoglicol - PEG 1500 (Sigma), na proporção de 1:1, conforme a metodologia descrita por KOHLER & MILSTEIN (1975). As células obtidas da fusão foram ressuspensas em meio de Dulbecco, contendo aminopterina, hipoxantina e timidina - HAT (Sigma) e, cultivadas (10<sup>5</sup> células por poço) em microplacas de 96 poços por um período de 14 dias. Em seguida, o meio HAT foi substituído por HT (sem aminopterina) e cultivadas por

mais 14 dias. Os sobrenadantes das células híbridas (hibridomas) foram avaliados pelo teste ELISA, para detecção de anticorpos específicos contra a toxina D. Os hibridomas secretores de anticorpos específicos, foram clonados por diluição limitante. Os sobrenadantes desses clones foram analisados quanto ao isotipo pelo teste ELISA e caracterizado quanto ao perfil da toxina pela reação de Western blotting.

## RESULTADOS

*Perfil eletroforético das toxinas botulínicas.* As toxinas obtidas junto ao Vallée Nordeste S/A foram analisadas por eletroforese, tanto na sua forma inatura quanto após precipitação em sulfato de amônio, sendo que o perfil protéico observado foi característico das toxinas botulínicas apresentando peso molecular aparente de 150 kDa, ao se comparar com

padrão de IgG (Fig.1). Além de proteínas de alto peso molecular foi observado também outras proteínas de menor peso que provavelmente sejam contaminantes de meio de cultura, pois após a precipitação com sulfato de amônio houve baixa detecção destes contaminantes.

A toxina botulínica tipo D obtida demonstrou claramente sua atividade tóxica, uma vez que houve morte, com sintomatologia clínica característica de botulismo, de todos os camundongos inoculados, no período de observação de 48 horas.

***Produção dos hibridomas.*** Foram realizados 4 experimentos de fusão, dos quais obteve-se sucesso em apenas um. Os demais experimentos foram perdidos devidos a fatos inerentes da tecnologia de produção de hibridomas, tais como PEG adequado e ajuste do tempo de fusão.

A última fusão realizada, obteve-se 76 hibridomas, correspondendo 26,4%. Os sobrenadantes destes 76 hibridomas foram analisados por ELISA, para se avaliar a presença de anticorpos anti-toxina D. Observou-se que quatro deles estavam secretando imunoglobulinas específicas para a toxina tipo D, com absorvância superior a 0,350 nm, considerado limiar de detecção (Tab 1). Os clones foram denominados de 1H10, 1F7, 2A1, 2H8. O isotipo dos anticorpos monoclonais (MAb) obtidos foram do tipo IgG3, cadeia leve *kappa*. Quando os sobrenadantes destes MAb, foram analisados por Western blotting, observou-se que apenas um dos clones obtidos (2H8) reconheceu uma proteína de peso molecular aparente de 150 kDa (Fig. 2) correspondente ao peso molecular da toxina botulínica.

## DISCUSSÃO

A utilização de anticorpos monoclonais na caracterização de antígenos tem trazido grandes contribuições no diagnóstico de diversas patologias e infecções. No caso do botulismo, tem possibilitado a detecção de toxina em fluidos de cultura e amostras de alimentos (FERREIRA *et al.*, 1987; NOAH *et al.*, 1995). Ainda, a identificação do mecanismo de ação da toxina e a distinção de estruturas antigênicas dos diferentes tipos de toxina da família dos clostrídios (KUBOTA *et al.*, 1997; KOZAKI *et al.*, 1998). Com essas ferramentas, é possível reconhecer os domínios tóxico e não tóxico da proteína, bem como toda estrutura da molécula (BAVARI *et al.*, 1998) e desse modo, desenvolver métodos de diagnóstico mais precisos e menos dispendiosos.

O presente trabalho desenvolveu a produção de anticorpos monoclonais contra a toxina botulínica tipo D, com o

propósito de se obter reagentes para serem utilizados em métodos de diagnósticos “**in vitro**”.

No presente trabalho obteve-se 26,4% de produção de hibridoma, demonstrando o sucesso deste método, pois na literatura consta que apenas cerca de 20% da fusão obtém-se híbridos viáveis ou seja, células que contêm as características tanto do mieloma quanto dos esplenócitos. Embora, os quatro mAbs obtidos tenham apresentado alta reatividade pelo teste ELISA, o mesmo não ocorreu quando foram analisados por Western blotting. Estes resultados são explicados pelo fato que no ELISA o tampão utilizado na diluição da toxina, para sua imobilização na placa, não altera a estrutura conformacional da proteína que se liga ao mAb. Por outro lado, o tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) no preparo das amostras de toxina para

migração eletroforética das proteínas, além da alteração das cargas (+/-) pode também expor epítopos diferentes daqueles expostos processo de sensibilização das placas utilizadas no teste ELISA, devido utilização de tampão com pH alcalino. Neste sentido, vale ressaltar os trabalhos desenvolvidos por BROWN, LLOYD, SCHMIDT (1997) os quais demonstraram que mAbs produzidos contra a toxina botulínica tipo E, não reconhecia a toxina quando se utilizavam agentes desnaturantes tais como SDS ou uréia. Demonstrou-se desse modo, que o reconhecimento da toxina pelo anticorpo era dependente da exposição de epítipo conformacional.

Os mAbs 1F7, 1H10, 2A1, reconheceram a toxina inatura. Além disso, quando a toxina foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA), perdeu-se a capacidade de reconhecimento. Por outro lado, o mAb 2H8, ainda foi capaz de

reconhecer a toxina mesmo após tratamento com TCA. Este tipo de procedimento, pode levar a modificações conformacionais na proteína, alterando a exposição do sítio de ligação do mAb com a toxina. Desse modo, os dados apresentados no presente trabalho, sugerem que o mAb 2H8 possua reconhecimento estrutural. Já os demais anticorpos devem ser específicos de epítopos conformacionais. No entanto, mais análises deverão ser realizadas para se demonstrar com clareza qual(ais) epítipo(s) da toxina está se ligando ao mAb obtido e, desse modo, poder utilizar estes reagentes na pesquisa da toxina botulínica tipo D em diferentes amostras biológicas.

### **Agradecimentos**

Ao Instituto Valleé Nordeste SA, pelo fornecimento das toxinas botulínicas tipo D.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAVARI, S., PLESS, D.D., TORRES, E.R., LEBEDA, F.J., OLSON, M.A. Identifying the principal protective antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin. **Vaccine n. 16 v. 19:** p.1850-1856. 1998
- BROWN, D.R., LLOYD, J.D., SCHMIDT, J.J. Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody against botulinum neurotoxin serotype F, following vaccination with active toxin. **Hybridoma n. 16 v. 5:** p. 447-456. 1997.
- BURNETT, W.N. "Western blotting": Eletrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiography detection with antibody and radioiodinated protein A. **Ann. Biochem. n. 12:** p. 195-203. 1981.
- CECIL, R. Botulismo. In: **Tratado de Medicina Interna**. vol. 2, 20<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997. pp. 1805-1807.
- CHAMBERLAIN, P. THOMAS, R.J. An outbreak of botulism in a deer herd in Queensland. **Aust. Vet. J. n. 72:** p. 427-428. 1995.
- DASGUPTA, B.R. The structure of botulinum neurotoxin. In: L.L. Simpson (ed). **Botulinum neurotoxin and tetanus toxin**. Academic Press. Inc. San Diego, Calif. 1989. pp.53-67.
- DÖBEREINER, J., TOKARNIA, C.H., LANGENEGGER, J., DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wschr n. 99:** p. 188-190. 1992.
- DOWELL, V.R., HAWKINS, T.M., **Laboratory methods an anaerobic**

- bacteriology.** Center for Disease Control Atlanta, Ga. 1974.
- EDWARDS, R. C., BUTT, F.Y.S., BONACCI, C. A. & KENDALL, K.A. Wound botulism: a clinical experience. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **n. 117** v. 6: p. S214-S218. 1997.
- FERREIRA, J.L., HAMDY, M.K., HERD, Z.L., McKAY, S.G., ZAPATKA, F.A. Monoclonal antibody for the detection of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Mol Cell Probes* **n. 1** v. 4: p. 337-345. 1987
- GRIFFIN, P.M., HARTHEWAY,C.L., ROSENBAUM, R.B., SOKOLOW, R. Endogenous antibody production to botulism toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's disease. *J. Infect. Des.* **n.175:** p. 633-637. 1997.
- HATHEWAY, C.L.. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **n. 3:** p. 66-98. 1990.
- HIBBS, R.G., WEBER,J.T., CORWIN A., ALLOS, B.M., EL REHIM, M.S.A., EL SHARKAWY, S., SARN, J.E., McKEE Jr, K.T. Experience with the use of an investigation F(ab')<sub>2</sub> heptavalent botulism immune globulin of equine origin during an outbreak of type E botulism. *Clin. Infect. Dis.* **n. 23:** p. 337-340. 1996.
- KELLY, A.P., JONES, R.T., GILLICK, J.C., SIMS, L.D. Outbreak of botulism in horses. *Equine. Vet. J.* **n. 16:** p. 519-521.1984.
- KOHLER, G. MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **n. 256:** p. 485-497. 1975.
- KOZAKI, S., KAMATA,Y., NISHIKI, T., KAKINUMA, H., MARUYAMA,

- H., TAKAHASHI, H., KARASAWA, T., YAMAKAWA, K., NAKAMURA, S. Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. **Infect Immun** n. **66** v. 10: p. 4811-4816. 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature (London)**: p. 680-685. 1970
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** n. **193**: p. 265-275. 1951.
- MAIN, D.C., GREGORY, A.R. Serological diagnosis of botulism in dairy cattle. **Aust. Vet. J.** n. **73**: p. 77-78. 1996.
- MIDURA, T. F. Infant botulism. **Clin. Microbiol. Rev.** n. **9** v. **2**: p. 119-125. 1996.
- MIDURA, T.F., ARNON, S.S. Infant botulism: Identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in feces. **Lancet** ii: p. 934-936. 1976.
- MONTECUCCO, C. & SCHIAVO, G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. **Mol. Microbiol.** n. **13**: p. 1-8. 1994.
- MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analyt. Biochem.** n. **117**: p. 307. 1981.
- NOAH, C.W., POTEET, S.S., RAMOS, N.C., PEREZ, J.C., HUANG, S.Y. Production of monoclonal antibodies specific to *Clostridium botulinum* type B

- neurotoxin. **J AOAC Int n. 78 v.2:** p. 381-385.1995.
- NOTERMANS,S. DUFRENNE, J., LEITE, R.C. 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. n. 5:** p. 203-311. 1982.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg. n. 27:** p. 493-497. 1938.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., ÁVILA, F.A., PIRIESE, J.E., YOKOYA, F. An outbreak of type C botulism in broiler chickens in São Paulo state, Brazil. **Rev. Microbiol. n. 16:** p. 31-35. 1985.
- 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. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D. **Pesq. Vet. Bras. n. 11:** p.13-16. 1991.
- STERNE, M. & WENTZEL, L.M. A new method for the large-scale production of high-titre botulinum formol-toxoid types C and D. **J. Immunol. n. 65:** p. 175-183. 1950.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T.& GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA n. 76:** p. 4350-4354. 1979.
- TRUEMAN, K.F., BOCK, R.E., THOMAS,R.J., TAYLOR, J.D., GREEN, P.A . **Vet. Rec. n. 130:** p. 398-402. 1992.

- WEBER, J.T., HATHEWAY, CL., St. LOUIS, M.E. Botulism. In: HOEPRICH, P.D., JORDAN, M.C., RONALD, A .R., eds,. **Infections diseases**, 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott. 1994. pp.1185-1194.
- WICTOME, M., NEWTON, K.,JAMESON, K., HALLIS, B., DUNNIGAN, P., MACKAY, E., CLARKE, S., TAYLOR, R., GAZE, J., FOSTER, K., SHONE, C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. **Appl. Environ Microbiol. n. 65:** p. 3787-3792.
- WRIGHT, H.D. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for pneumococcus and other organisms. **J. Path. Bact. n. 37:** p. 257. 1933.

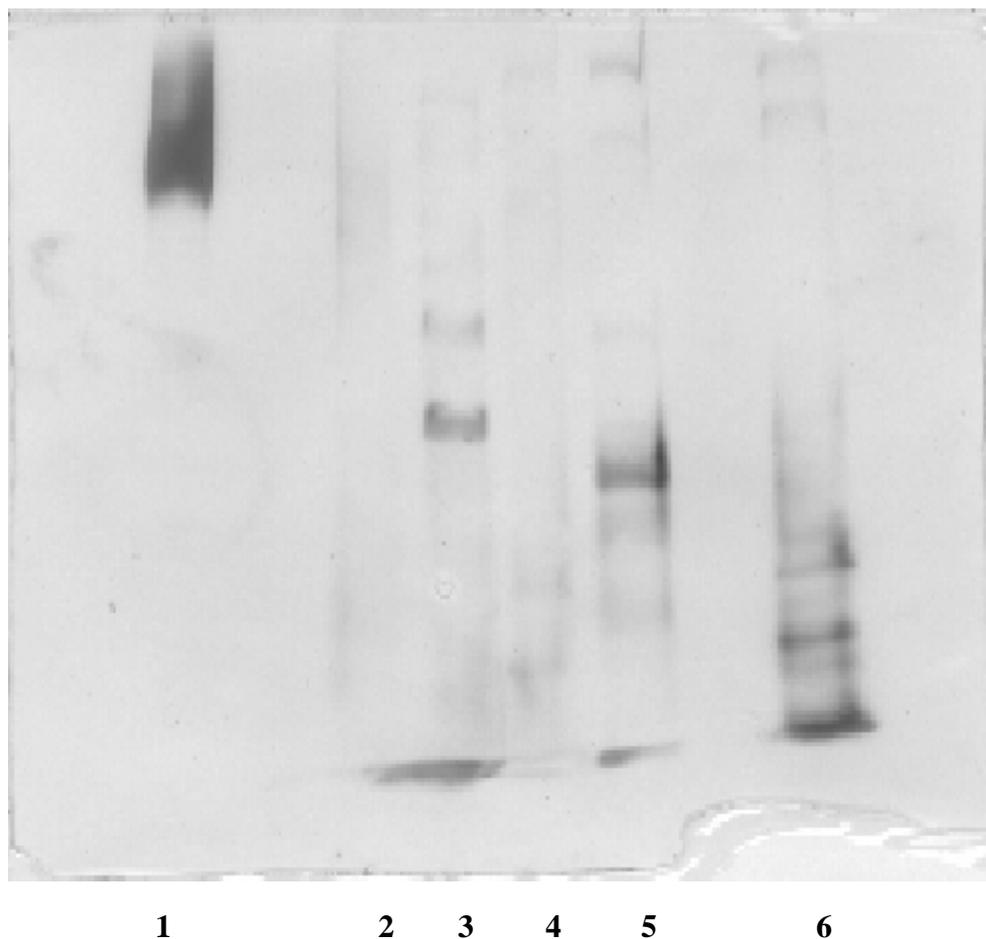
**Tabela 1 - Reatividade dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas frente a toxina D, pelo teste ELISA.**

Amostras	Absorbância a 492 nm		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Soro mune <sup>1</sup>	> 0,507 +/-0,016	> 0,667 +/-0,012	> 0,757 +/-0,032
Soro não imune <sup>2</sup>	< 0,268 +/-0,017	< 0,205 +/-0,031	< 0,207 +/-0,017
Sobrenadante <sup>3</sup> 1H10	> 0,493 +/-0,021	> 0,437 +/-0,015	> 0,499 +/-0,016
Sobrenadante 1F7	> 0,535 +/-0,018	> 0,421 +/-0,032	> 0,476 +/-0,014
Sobrenadante 2A1	> 0,422 +/-0,025	> 0,476 +/-0,019	> 0,456 +/-0,018
Sobrenadante 2H8	> 0,397 +/-0,032	> 0,461 +/-0,021	> 0,542 +/-0,020

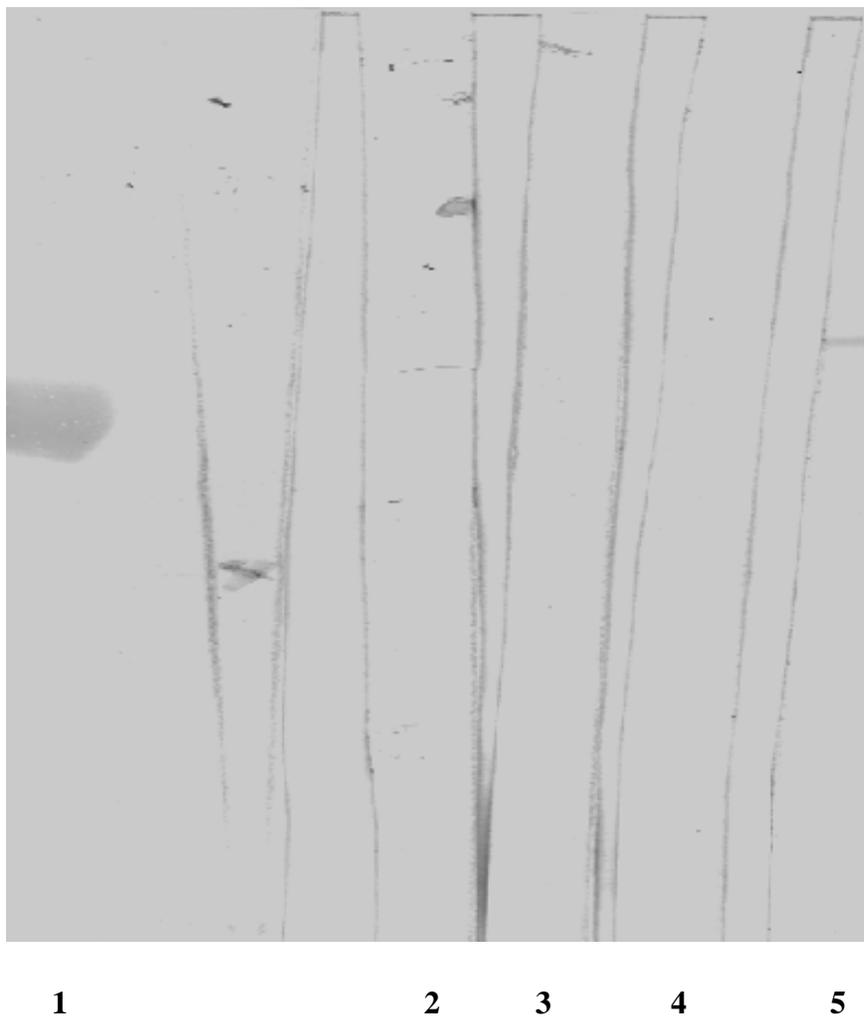
<sup>1</sup>Como soro imune, foi utilizada a amostra obtida de camundongo imunizado com o toxóide botulínico tipo D após o último reforço, cujas células de baço foram utilizadas na fusão, essa amostra foi utilizada em uma diluição fixa de 1/50.

<sup>2</sup> Soro não imune, corresponde a amostras de sangria prévia de camundongos que não receberam toxóide botulínico, essa amostra foi utilizada na diluição fixa de 1/50.

<sup>3</sup> Os sobrenadantes foram coletados das culturas de hibridomas e intervalos de três dias e utilizado na reação sem diluir.



**Figura 1 - Análise eletroforética da toxina botulínica tipo D.** Diferentes toxinas botulínicas tipo D, obtidas do Vallée Nordeste S/A em 1998 e 1999, foram analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 7%) e visualizadas pelo método de coloração prata. Pista 1 corresponde à IgG purificada de peso molecular de 150 kDa; pistas 2 e 3, toxina botulínica obtida em 1998; pista 4, corresponde à toxina botulínica obtida em 1999, precipitada com sulfato de amônia a 40%; pista 5 e 6, corresponde à toxina botulínica obtida em 1999 sem precipitação.



**Figura 2 - "Western blotting" dos anticorpos monoclonais produzidos contra a toxina botulínica tipo D.** Pista 1, corresponde à IgG de camundongo purificada que apresenta peso molecular de 150 kDa. Pistas 2, 3, 4 e 5 correspondem aos sobrenadantes dos clones 1H10, 1F7, 2A1 e 2H8, respectivamente.