



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA

**REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA  
PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA  
NEUROTOXINA DE *Clostridium botulinum* TIPO A EM PALMITO**

**Erika de Oliveira**

**MsC. Microbiologia**

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Janeiro de 2008

## 1. INTRODUÇÃO

O botulismo é uma enfermidade causada pela ação de uma toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, que causa paralisia flácida de evolução aguda podendo levar a morte (POLAQUINI et al., 1997).

Existem três formas da doença: botulismo alimentar, que ocorre através da ingestão de alimentos com a toxina; botulismo infantil, que acomete crianças menores de um ano de idade e o botulismo em feridas ou infeccioso, onde ocorre a produção de toxina em ferimentos (PIERSON e REDDY, 1988).

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria em forma de bastonete, anaeróbia, Gram-positiva, móvel com flagelos peritríquios, produtora de esporos, encontrado no solo, alimentos, fezes e meio ambiente (CATO et al., 1986).

A história desse bacilo iniciou-se em 1820 na cidade de Wurtemberg na Alemanha com os trabalhos do médico Justinus Kerner, onde verificou 234 casos de intoxicação após ingestão de salsichas, daí ficando conhecido como o causador da “enfermidade de Kerner” (WALTER LEDERMANN D, 2003).

Em 1897 Emile Pierre e Van Ermengem, na Bélgica, isolaram um bacilo anaeróbio, após a investigação de amostras de presunto servidas a músicos em um funeral, cuja ingestão casou três óbitos dos 33 casos isolados, ficando conhecido como *Bacillus botulinus*, do latim “botulus” = salsicha (SMITH, 1977).

Começou a se pensar que a doença estivesse associada a produtos carneos, quando ocorreu na Alemanha um surto com 11 mortes por ingestão de salada de feijão enlatado contaminado com a bactéria (SMITH, 1977).

O *Clostridium botulinum* produz potentes neurotoxinas características (BoNT – *botulinum neurotoxin*) que podem causar uma condição de neuroparalisia, freqüentemente fatal, conhecida como botulismo (McGRATH et al., 2000).

A toxina botulínica é considerada o veneno mais potente já conhecido e seriam necessários apenas 40 gramas para mata uma população de seis bilhões de habitantes (ARNON, 1997) (WALTER LEDERMANN D, 2003).

Hoje, já são conhecidos sete sorotipos (A-G) de toxinas, cada um produzido por diferentes cepas de *C. botulinum* que causam paralisia muscular flácida a partir do bloqueio da liberação do neurotransmissor acetilcolina nas junções neuromusculares (SINGH, 2000).

Atualmente, conservas vegetais e produtos de origem animal têm sido veículos mais comuns do botulismo, assim, a detecção e a identificação rápida da toxina botulínica são essenciais para o diagnóstico da doença e para a identificação do alimento causador da enfermidade, visto a demora relacionada ao teste do bioensaio (HATHEWAY e FERREIRA, 1996).

No presente estudo, a detecção dos níveis de RNAm da toxina botulínica tipo A em palmito foi avaliada pelo teste do bioensaio e PCR quantitativo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Surtos de botulismo são descritos em todos os continentes e estão associados a produtos que variam de acordo com os hábitos alimentares da região ou país GELLI et al., (2002). Como exemplos podemos citar: conservas domésticas (EUA), produtos cárneos curados de forma inapropriada (Europa) e produtos marinhos fermentados (Japão, Alaska) (Hauschild, 1989; Bean e Griffin, 1990; Gaze, 1992 citados por SZABO et al., 1994).

Os *C. botulinum* tipos A, B e E têm sido a causa de botulismo humano na maioria dos surtos descritos, sendo apenas alguns casos atribuídos à toxina botulínica do tipo F (SCICCHITANO & HIRSHFIELD, 1996).

No Brasil, os casos registrados da doença são causados, principalmente, pela toxina tipo A e em menor ocorrência pelo tipo B, associados às conservas em geral. (EDUARDO et al., 2007). Podemos também destacar no Brasil nos anos de 1.979 a 2.002 registros de 125 casos com 75 óbitos, sendo 3 por ano e em sua maioria causados devido a alimentos contaminados pela toxina tipo A (EDUARDO et al., 2002). Ainda nos anos de 1.999 a 2.004, 41 casos suspeitos de botulismo foram notificados, sendo confirmado um caso por botulismo em feridas e 18 casos de botulismo de origem alimentar após a ingestão de carne suína, palmito em conserva, patê de fígado e lingüiça curada industrializada, com taxa de letalidade de 77% (EDUARDO et al., 2002).

No Estado do Rio Grande do Sul no ano de 1.958, nove pessoas morreram após consumirem conserva caseira de peixe, constituindo a primeira epidemia de botulismo no Brasil (SANTIAGO, 1972). Caso semelhante ocorrido em 1.987 em Mina Gerais, envolvendo 7 pessoas de uma única família que ingeriram conserva

caseira suína. Após onze meses um novo caso ocorreu no mesmo Estado, sendo assim considerada a segunda epidemia de botulismo no Brasil (GELLI et al., 2002).

Já em 1.982 no Rio de Janeiro um surto de botulismo alimentar foi relatado, após a ingestão de patê de galinha por duas pessoas ocorrendo um óbito (SERRANO et al., 1982).

No Estado de São Paulo, o primeiro caso confirmado de botulismo tipo A foi em 1.990 após a ingestão de conserva vegetal “picles”. Seguido dos anos de 1.997 e 1.999, onde ocorreram 3 casos confirmados por ingestão de palmito contaminado pelo mesmo tipo de toxina (EDUARDO et al., 2002).

Há muito empenho, por parte da indústria alimentícia, em assegurar que os processos de tratamento dos alimentos previnam o crescimento do *C. botulinum* e a produção de toxina por esse agente. Dessa forma, há a necessidade da existência de ensaios específicos, sensíveis e rápidos para a detecção de toxinas botulínicas (WITCOME et al., 1999).

Atualmente, o único método que pode ser utilizado com confiança é o teste de toxicidade agudo em camundongos (bioensaio), o qual, embora extremamente sensível, com limite de detecção equivalente a 10 a 20 pg de toxina/mL, apresenta desvantagens como o alto custo, requer grande quantidade de animais, exige a utilização de testes de neutralização para a determinação do sorotipo da toxina, envolver a manipulação de animais de laboratório e o mais agravante, a demora em obter os resultados (McGRATH et al., 2000).

A tentativa de substituição dos testes de qualidade que utilizam animais de laboratório tem resultado no desenvolvimento de ensaios *in vitro*, os quais possam apresentar a sensibilidade e a confiabilidade do bioensaio em camundongos (WITCOME et al., 1999). Vários testes *in vitro* foram desenvolvidos e, entre eles, o

ELISA tem sido o mais amplamente utilizado em análise de alimentos. No entanto, a complexidade de utilização e a sensibilidade e acurácia menores não permitem seu emprego de forma definitiva (KIMURA et al., 2001).

Foi desenvolvido um método *in vitro* baseado na reação em cadeia da polimerase para detecção da toxina botulínica tipo B, o qual parece ter resolvido essas deficiências (WITCOME et al., 1999).

Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, testes baseados na reação em cadeia da polimerase têm a vantagem de serem rápidos para identificação precisa do agente patogênico. Por outro lado, as reações de PCR, cujos resultados podem ser visualizados somente após eletroforese, são primariamente qualitativas e não proporcionam quantificação exata da seqüência-alvo. Essa quantificação tem sido obtida com utilização dos testes de PCR-Número Mais Provável (MPN PCR), PCR competitivo e PCR-ELISA (KIMURA et al., 2001).

Como esses métodos exigem a manipulação múltipla dos tubos de cultura (MPN PCR), a utilização de padrão interno com eficiência de amplificação equivalente na técnica de PCR (PCR competitivo), e tratamento do produto após a amplificação (PCR-ELISA), a abordagem para análise do risco associado ao *C. botulinum* em amostras de alimentos poderia ser simplificada e vantajosa se o PCR quantitativo fosse realizado em sistema automatizado (WITCOME et al., 1999).

Muito embora a detecção de cepas de *C. botulinum* tipo A em alimentos pela técnica de PCR já tenha sido descrita (FACH et al., 1993), a grande maioria de estudos tem demonstrado a amplificação da seqüência codificadora da toxina E em amostras de peixes (HIELM et al., 1996; SCIACCHITANO e HIRSHFIELD, 1996; KORKEALA et al., 1998).

A detecção múltipla dos genes das neurotoxinas botulínicas A-E foi descrita por SZABO et al. (1993) a partir da utilização de primers específicos para cada um dos genes-alvo. Por outro lado, FACH et al. (1995) relataram a utilização da técnica de PCR para detecção dos genes BoNT A, B, E, F e G em amostras de alimentos a partir da utilização de um único par de primers degenerados. No entanto, o protocolo exigia a utilização de sondas específicas marcadas com digoxigenina para identificação dos sorotipos das toxinas.

Ensaio quantitativo semi-automatizado, de alta sensibilidade e em tempo real, têm sido descritos para quantificação de agentes virais e bacterianos em alimentos. NOGVA et al., (2000) relataram a aplicação do sistema TaqMan para detecção quantitativa da presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de água, leite desnatado e integral não pasteurizados.

Por outro lado, OLEKSIWEICZ et al., (2001) descreveram o desenvolvimento de teste de RT-PCR em tempo real para quantificação do vírus da febre aftosa em tecido suíno, com o intuito de verificar a possível utilização do sistema TaqMan para controle de qualidade da carne suína.

No que se refere ao *C. botulinum*, KIMURA et al., (2001) relataram o monitoramento quantitativo da presença de cepas de *C. botulinum* tipo E em peixe embalado em atmosfera modificada. YOON et al. (2005) descrevem a técnica como um método rápido e preciso para diagnóstico do botulismo tipo A em alimentos.

Porém, a limitação desse método se deve ao fato de a quantificação se relacionar ao número de cópias do gene codificador, mas não da própria toxina. Nesse contexto, a quantificação do RNA mensageiro parece ser mais apropriada para o conhecimento do risco associado à presença do *C. botulinum* em amostras de alimentos.

Uma seqüência de RNA molde, fita simples (mRNA) é reversamente transcrita em cDNA através da enzima transcriptase reversa e a molécula resultante é submetida a uma reação de PCR em tempo real, possibilitando a verificação da expressão gênica, bem como avaliação dos transcritos que serão traduzidos em proteínas.

O ensaio quantitativo em tempo real baseado no sistema de detecção com marcador SYBRGreen®, disponível comercialmente, em combinação com o sistema analítico de PCR em tempo real que se baseia na ligação do fluoróforo entre a fita dupla de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Após o reconhecimento dos iniciadores algumas moléculas de SybrGreen podem se ligar na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas de SyberGreen vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação, as moléculas de SyberGreen são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM et al.,1999).

### **3. OBJETIVOS**

3.1.Desenvolver e aplicar o PCR quantitativo para detecção de transcritos de RNA mensageiro da toxina botulínica tipo A em palmito.

3.2.Determinar a sensibilidade, a especificidade analítica entre a nova técnica de PCR quantitativo e o teste do bioensaio em camundongos.

3.3.Aplicar a técnica de PCR quantitativo para o controle de qualidade de alimentos

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

**4.1. Obtenção e cultivo das cepas de *Clostridium*:** Foi utilizada para o experimento cepa referência de *C. botulinum* ATCC 19397 para a toxina A, como controle negativo e para verificação da especificidade dos primers foram utilizadas cepas referência de *Clostridium botulinum* tipo B, C, D, E, F, G, *Clostridium butyricum*, *baratii* e *argentinense*. Todos os isolados foram inoculados em meio Tripticase-Pepton-Glicose-Extrato de levedura (TPGY) e incubados a 37°C, por 24 horas em anaerobiose (SZABO et al., 1993).

**4.2. Material utilizado para inoculação:** As amostras utilizadas neste experimento foram trinta vidros de Palmito comercial industrializados contendo 550g peso bruto e 300g peso drenado, composto por palmito, água e ácido cítrico, comercializados em supermercados do interior do Estado de São Paulo. Destes vidros, nove foram utilizados como amostras controle sem os conservantes industriais e a solução original foi substituída por água peptonada a 0,1% previamente esterilizada.

Em todas as amostras foram realizados testes para verificar a presença de esporos de *Clostridium botulinum* ou toxina botulínica, antes da inoculação.

**4.3. Teste de pureza da cepa:** A cultura de *Clostridium botulinum* tipo A foi inicialmente ativada, inoculando material em frascos contendo 225mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 0,05 % de cloridreto de cisteína e incubado a 37°C por até 24 horas.

Após o crescimento, a cultura foi testada quanto a sua pureza. Para tal, foram semeadas placas de Petri contendo Reinforced Clostridial Agar (RCA) e incubadas em anaerobiose a 37°C durante 24 horas.

A partir das colônias sugestivas de *Clostridium botulinum*, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram para verificar a presença de bastonetes retos, Gram positivos com esporos ovais, subterminais. Os isolados confirmados foram inoculados novamente em frasco contendo meio (TPGY) e incubado nas mesmas condições acima citadas, para verificar se a cultura produzia toxina botulínica (SCHOCKEN-ITURRINO et al. 1988a, SZABO et al., 1993).

**4.4. Preparo do inóculo:** Para o inóculo a cultura de *Clostridium botulinum* tipo A foi novamente inoculada em meio (TPGY) e incubada a 37°C sob condições de anaerobiose durante 7 dias (SEGNER et al., 1971).

Após o crescimento bacteriano que foi constatado por observação ao microscópio, a fração líquida foi centrifugada a 4.000xg durante 20 minutos. O material depositado foi ressuspensão em solução salina estéril e centrifugado novamente a 4.000xg.

Os esporos obtidos foram submetidos à limpeza com solução de lisozima a 3% e tripsina 0,5%, para eliminar restos de células vegetativas e do meio (GRECZ et al., 1962). Depois de limpos os esporos foram colocados em frasco esterilizado contendo solução peptonada a 0,1%. (SCHOCKEN-ITURRINO & YOKOYA, 1980).

Para determinar o número de esporos viáveis na suspensão, 100 mL desta, foi submetido a choque térmico, de 80°C por 10 minutos e logo após resfriados a 20°C em água com gelo, com a finalidade de eliminar as células vegetativas e ativar os esporos. (ANDO, 1973).

Realizado este processo, foram feitas diluições seriadas de razão 10 em solução de água peptonada a 0,1 % e imediatamente semeadas em placas de Petri em duplicata, contendo Agar Tripticase-Peptona-Glicose-Extrato de levedura (TPGYa) e incubadas a 37°C em condições de anaerobiose durante 24 horas.

A contagem de colônias das placas foi realizada por meio de contador de colônias Phoenix® determinando o número de UFC/mL. Os testes com palmito foram realizados em triplicata.

A partir dos frascos com suspensão de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A com concentrações conhecidas, foi realizado um inóculo de 0,5 mL a cada amostra de palmito. Após a inoculação os vidros foram fechados hermeticamente, acondicionados em bandejas e incubados a temperatura de 4°C, 25°C e 37°C durante 15 dias.

**4.5. Avaliação do experimento:** Após o período de incubação das amostras de palmito, foram colhidas duas alíquotas de 1 mL cada para a realização do teste de toxidez em camundongo (1) e isolamento e quantificação do RNA dos genes 16S DNAr do *Clostridium botulinum* e do gene BoNT/A, que codifica a toxina tipo A (2).

**4.6. Extração da toxina:** Foi retirada assepticamente uma porção de 40g de cada amostra de palmito, misturadas 1:5 com solução de gelatina tamponada pH 6,2 e armazenadas a 4°C overnight para extração da toxina (TANASUGARN, 1979, SMITH, 1977, SCHOCKEN-ITURRINO & YOKOYA, 1980). Após extração, o sobrenadante foi centrifugado a 12.000xg durante 20 minutos a 4°C, e filtrado em membrana de Millipore de 0,45 micras.

**4.7. Confirmação do tipo de toxina:** Para confirmar a presença da toxina, foram utilizadas antitoxinas botulínicas tipo A e B adquiridas do (Center for Disease Control (CDC) de Atlanta - USA) e uma nova partida adquirida do Instituto Butantã (lote nº 0310145). Estas foram diluídas de modo que cada 0,1 mL contivesse uma unidade internacional (cada U.I. neutraliza 100 DLM da toxina homóloga).

**4.8. Bioensaio:** Para o teste de neutralização da toxina botulínica, 1,2mL do extrato (previamente centrifugado a 12.000xg por 20 minutos a 4°C e filtrado em Millipore) foi misturado com 0,5mL de antitoxina A e 0,5mL de soro normal de coelho para os controles. Após o preparo das misturas, os tubos foram incubados em banho Maria a 37°C durante 30 minutos e logo depois de injetados intraperitonealmente (0,5mL/camundongo) em triplicatas, perfazendo um total de aproximadamente 90 camundongos (Aprovação do Comitê de Ética). Um controle com o extrato aquecido a 100°C durante 15 minutos também foi inoculado, com o intuito de descartar a ocorrência de mortes pela presença de outro tipo de substância, técnica essa preconizada por SMITH (1977), SCHOCKEN-ITURRINO, et al. (1985). Todos os camundongos receberam também 0,2 mL/camundongo de Quemicetina succinato com o intuito de evitar mortes inespecíficas (HOBBS, 1976; SMITH, 1977, SCHOCKEN-ITURRINO, et al., 1988b). Durante um período de até sete dias esses camundongos foram observados para verificar a presença de sinais característicos de botulismo ou morte (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1990, SCHOCKEN-ITURRINO & AVILA, 1991).

**4.9. Extração de RNA:** O RNA total foi isolado com kit Rneasy (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, o que incluiu tratamento com DNase por 15

minutos. A qualidade e a pureza do RNA obtido foram verificadas por espectrofotometria com comprimento de onda de 405 nm (OD260/OD280 entre 1.8 e 2.0) e eletroforese desnaturante em gel de agarose com formaldeído, em tampão MOPS.

**4.10. Síntese de cDNA:** O DNA complementar dos isolados foi obtido a partir de 100 ng do RNA total e utilização de 200 U da enzima transcriptase reversa Superscript III, 1 X tampão FSB (“First-Strand Buffer”), 5 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM dNTPs, 40 U RNaseOUT, e 300 ng de hexadesoxiribonucleotídeos aleatórios (“random primers”, pd(N)6) (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As condições de amplificação compreenderam incubação da mistura de RNA total, primers aleatórios e dNTP a 65°C por 5 minutos, seguida do acréscimo dos demais reagentes e incubação a 25°C por 5 minutos, 50°C por 1 hora e inativação a 70°C por 15 minutos.

**4.11. Amplificação das amostras no PCR quantitativo:** Primers específicos para os genes da toxina botulínica do tipo A e do controle interno para padronização das reações (16S) foram desenhados com o auxílio do software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tabela 1). Plasmídeos contendo as seqüências a serem amplificadas foram adquiridos comercialmente (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) e utilizados para a quantificação absoluta dos níveis de RNA mensageiro. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 µL com 1 X da mistura universal SYBR Green I (Applied Biosystems), 400 nM dos pares de primers (IDT), e 4 µL de diluição (1:4) do cDNA dos isolados. As reações foram

realizadas em triplicata, em placa de 96 poços, com a utilização do sistema de detecção de seqüências (SDS) ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

As condições (padrão) de amplificação compreenderam 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Curvas de dissociação foram geradas após o último ciclo de amplificação.

A quantificação absoluta dos transcritos de cada gene estudado foi obtida de acordo com o método absoluto de curvas padrão (User Bulletin # 2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf>), onde as equações das curvas para os dois genes foram interpoladas para estimar o número de cópias expressas do gene alvo em cada uma das amostras do experimento. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do software SDS v2.2.1 (Applied Biosystems).

Tabela 1 - Primers utilizados para quantificação absoluta de cDNAs alvo

Gene	Primer	Sequence	Tamanho (pb)	Acesso GenBank
BoNTA	BoNTA.F	5'- GTT GGT TTT GAG GAG TCA CTT GAA	74	DQ185901
	BoNTA.R	5'- GCT GGA TCC TGA GCA AAT TTG		
16S	16S.F	5'- GGT GAT CGG CCA CAT TGG	57	X73844
	16S.R	5'- ACT GCT GCC TCC CGT AGG A		

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Avaliação inicial das cepas*

A suspensão de *Clostridium botulinum* que foi utilizada como inóculo apresentou desenvolvimento de  $5,2 \times 10^7$  esporos/mL para o tipo A quando inoculada em meio (TPGY) e incubada a 37°C por 24 horas, e foi positiva para o teste de produção de toxina botulínica. Uma curva de desenvolvimento do *Clostridium botulinum* tipo A foi realizada em dois diferentes pHs sendo possível observar a multiplicação bacteriana em ambos. (Gráfico 1).

Adicionalmente, um gráfico da produção de toxina por esta cepa foi desenhado evidenciando o bom crescimento da cultura e grande produção de toxina. (Gráficos 2).

Figura 1 – Cinética do desenvolvimento bacteriano de cultura de *Clostridium botulinum* tipo A submetida a diferentes pHs e temperaturas. Jaboticabal/2007.

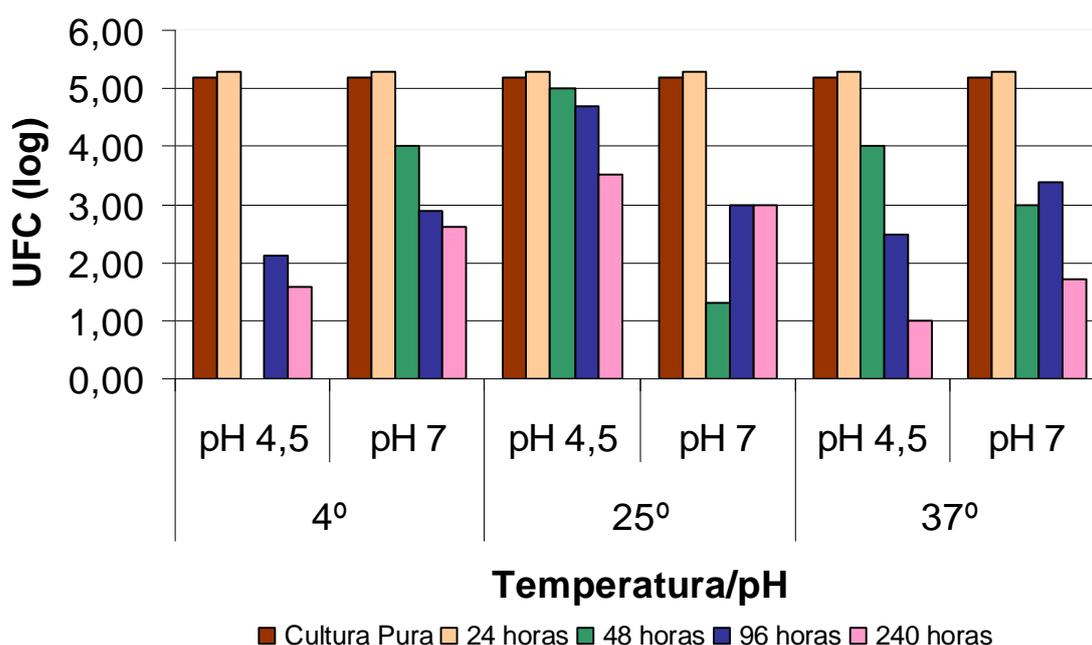
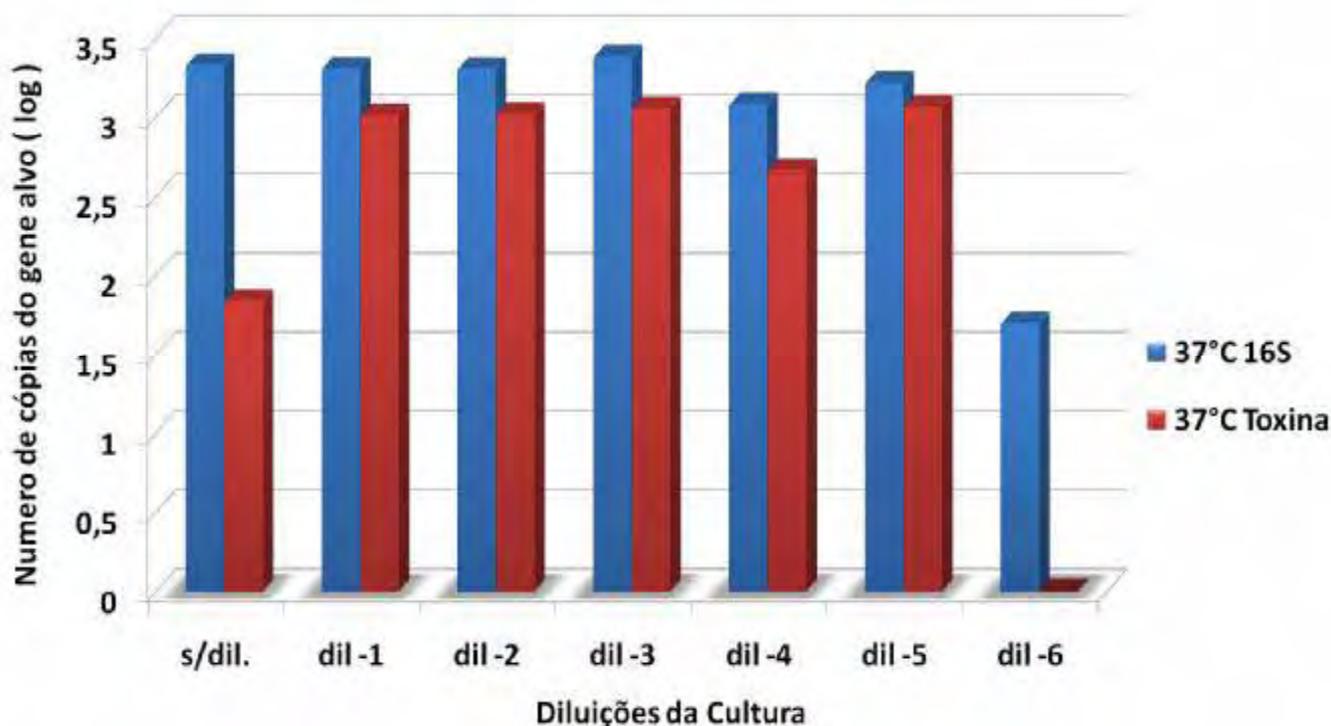


Figura 2 – Avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR para a detecção de transcritos de BoNT/A em cultura de *Clostridium botulinum* tipo A utilizada como inóculo. Jaboticabal/2007.



#### **Avaliação dos tratamentos e presença de toxina no bioensaio**

O teste do bioensaio, não mostrou a possível presença de toxina botulínica, em nenhuma das amostras de palmito a serem utilizadas para as inoculações experimentais.

Os resultados demonstraram que as amostras comerciais de palmito inoculadas com as suspensões de esporos de *C. botulinum* tipo A não produziram a toxina após 15 dias de incubação a temperaturas de 4°C, 25 °C e 37 °C, devido ao efeito inibitório dos conservantes utilizados e principalmente o pH. Resultados semelhantes foram encontrados por SHIN et al., (2006), observando o efeito

inibitório do nitrato de sódio e ácido sórbico sobre o crescimento celular e expressão gênica, mostrando que essas substâncias inibem o crescimento bacteriano e expressão em 70% quando administradas a 10ppm ou 2mg/mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Nas amostras de palmito preparadas experimentalmente com água peptonada 0,1% previamente esterilizada, foi detectada toxina botulínica em 100% dos casos, quando incubadas a 25 e 37°C. Ao contrário as amostras incubadas a 4°C tiveram uma menor porcentagem de produção de toxina com 43% de amostras positivas somente nas maiores concentrações de inóculo, o que evidencia a importância da temperatura no crescimento bacteriano (Tabela 2).

Tabela 2 - Bioensaio para detecção de toxina botulínica tipo A em palmito.

Diluições	Palmito sem conservantes*			Palmito comercial		
	Temperatura de Incubação			Temperatura de Incubação		
	4° C	25° C	37° C	4° C	25° C	37° C
10 <sup>0</sup>	+	+	+	-	-	-
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	-	-	-
10 <sup>-3</sup>	-	+	+	-	-	-
10 <sup>-4</sup>	-	+	+	-	-	-
10 <sup>-5</sup>	-	+	+	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	+	+	-	-	-

+ : morte de camundongos

\* : Palmito sem conservantes

### ***Avaliação dos níveis de RNAm da toxina botulínica tipo A pelo PCR quantitativo***

Curvas padrão de amplificação dos genes para BoNT/A e 16S DNAr, foram obtidas inicialmente afim de se determinar o comportamento do desenvolvimento celular nos tratamentos, bem como avaliar a expressão do gene envolvido na síntese da toxina.

Na obtenção das curvas padrão, diluições  $10^0$  a  $10^{-5}$  dos plasmídeos foram utilizadas, dando origem a valores de Ct entre 19 e 30 para o gene BoNT/A e entre 20 e 30 para o 16S DNAr. Estas curvas mostraram valores de correlação logarítmica de 0,99 e 0,97, respectivamente, o que confere alta confiabilidade aos dados de quantificação gerados por meio da aplicação desta técnica (Gráfico 3 e 4).

Figura 3 – Curva padrão de detecção e de dissociação do gene 16S RNAr determinadas no PCR quantitativo. Jaboticabal/2007.

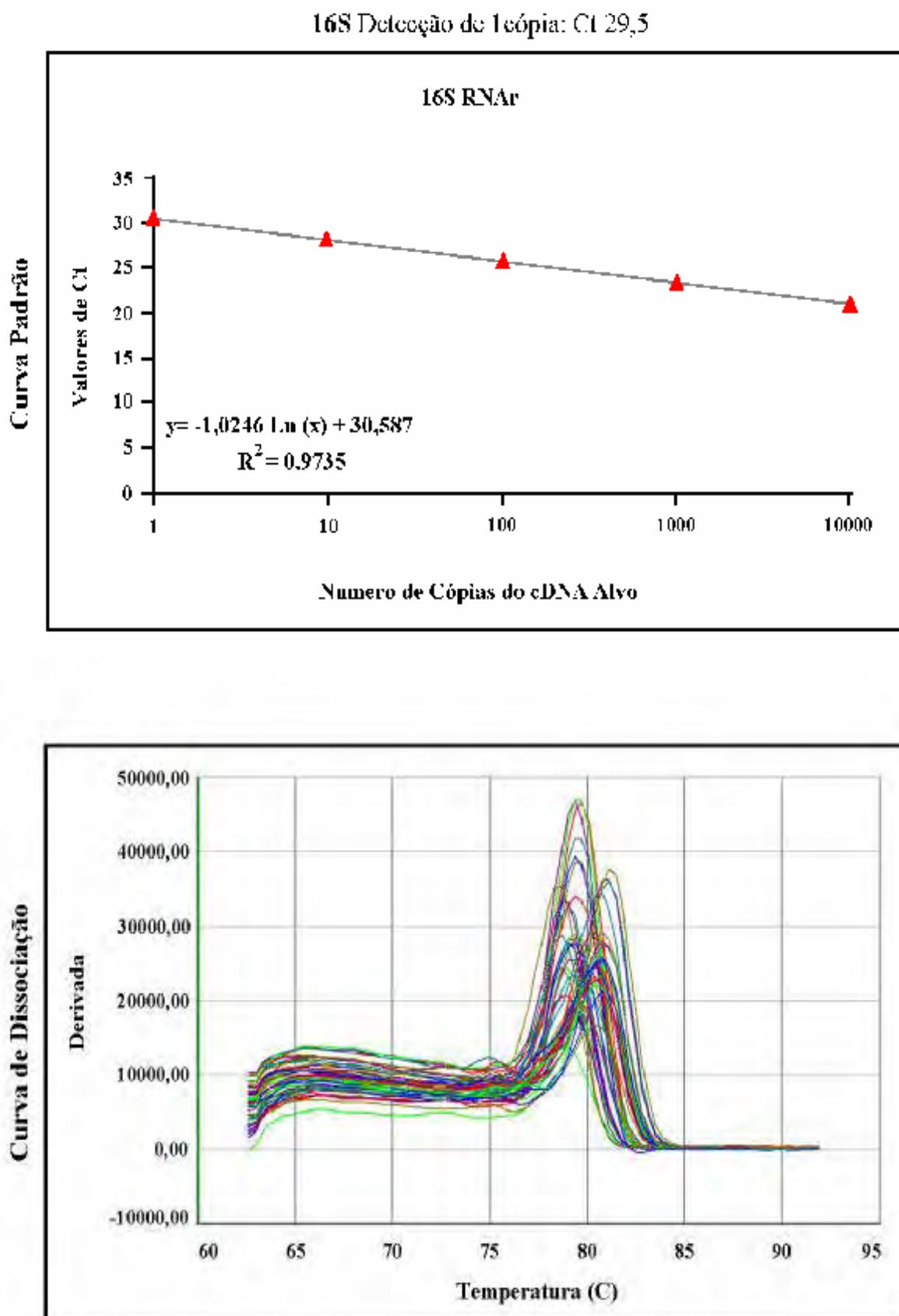
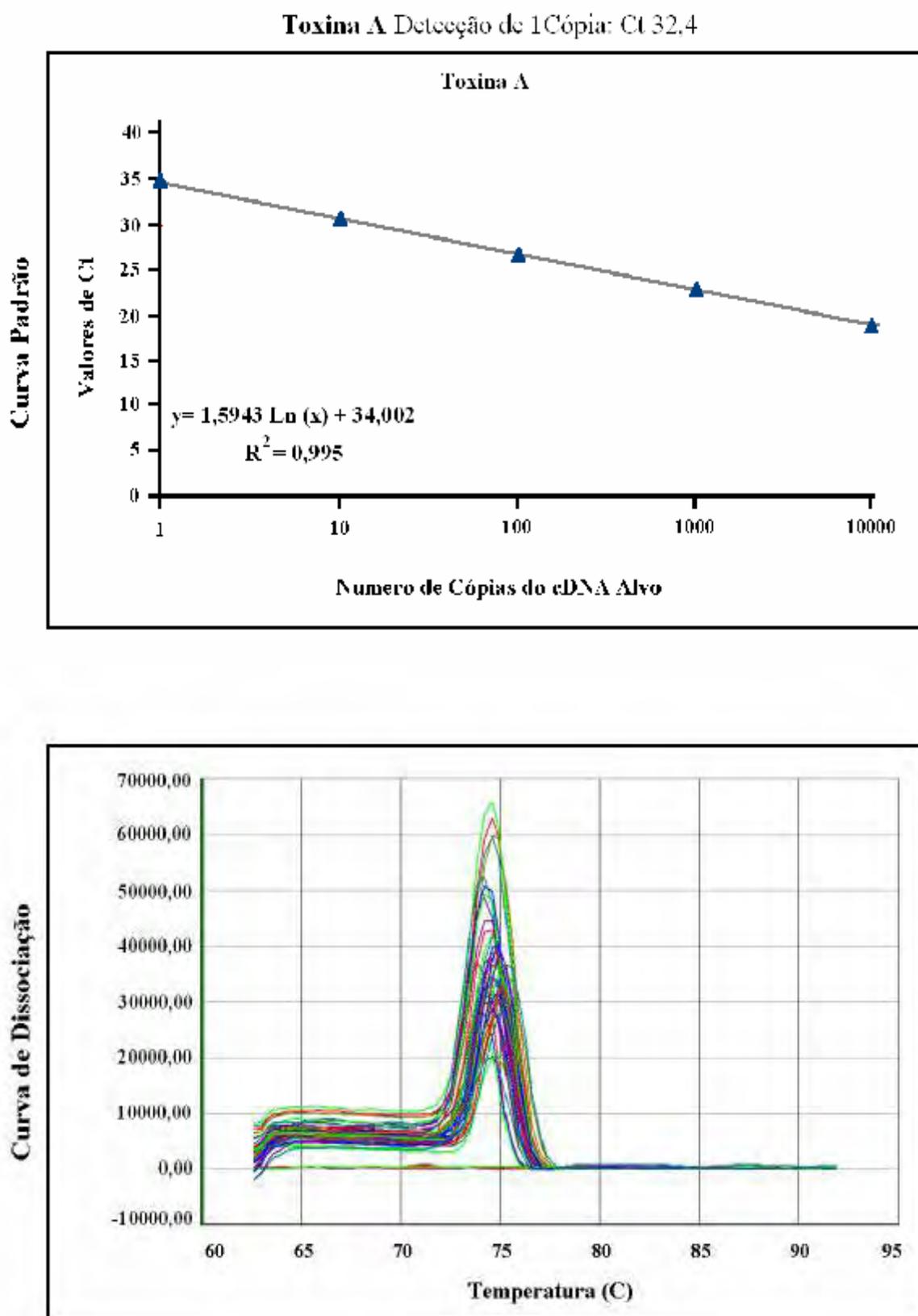
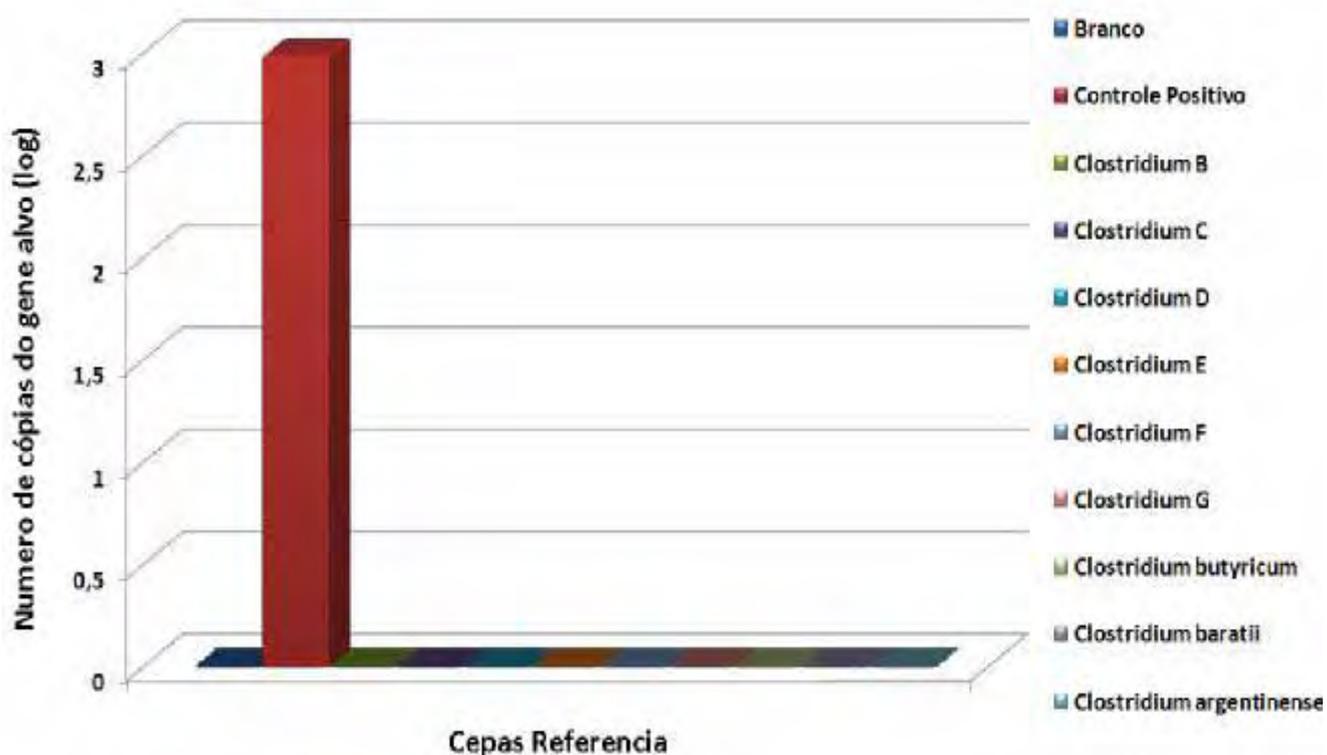


Figura 4 – Curva padrão de detecção e de dissociação do gene BoNT/A determinadas no PCR quantitativo. Jaboticabal/2007.



Adicionalmente, as curvas de dissociação dos produtos de amplificação mostraram a especificidade dos pares de primers utilizados nas reações que foram monitoradas quantitativamente juntamente com as cepas referência de *Clostridium* tipos B, C, D, E, F, G, *baratii*, *argentinense* e *butyricum* que não apresentaram amplificação (Gráfico 5).

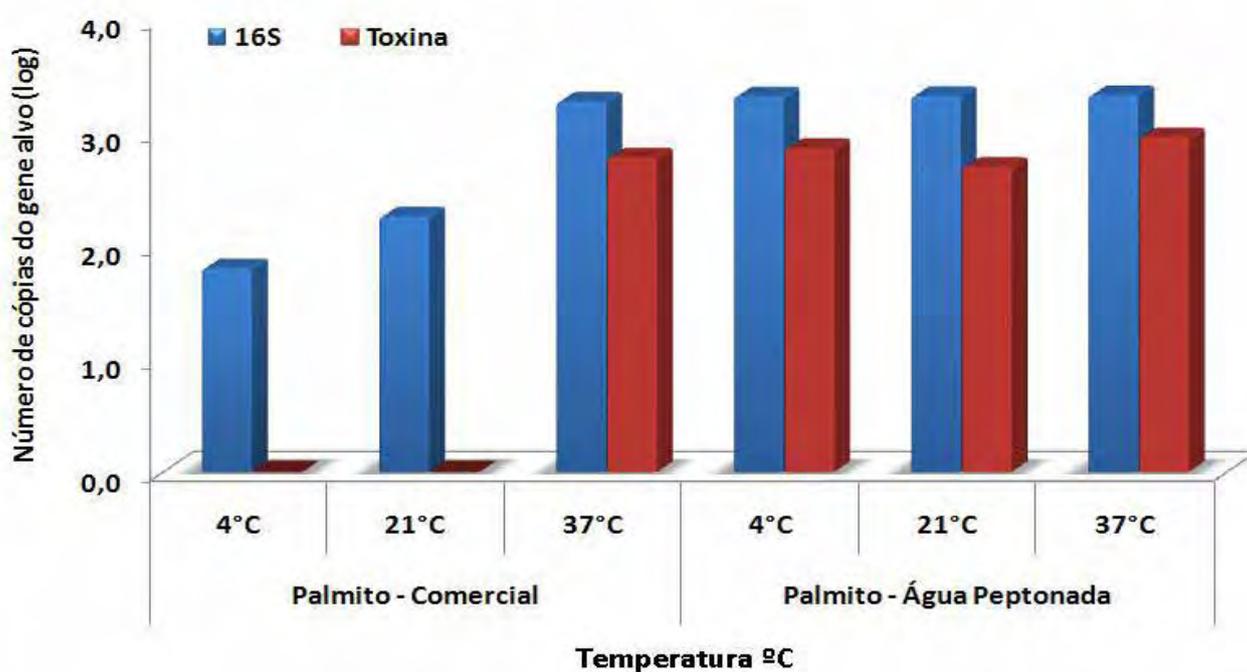
Figura 5 – Avaliação da especificidade analítica da técnica de PCR quantitativo para a detecção de transcritos de BoNT/A em diferentes cepas de *Clostridium botulinum*. Jaboticabal/2007.



Com as equações para quantificação dos respectivos genes alvo, as quantidades de transcritos do gene BoNT/A foram determinadas para cada um dos tratamentos.

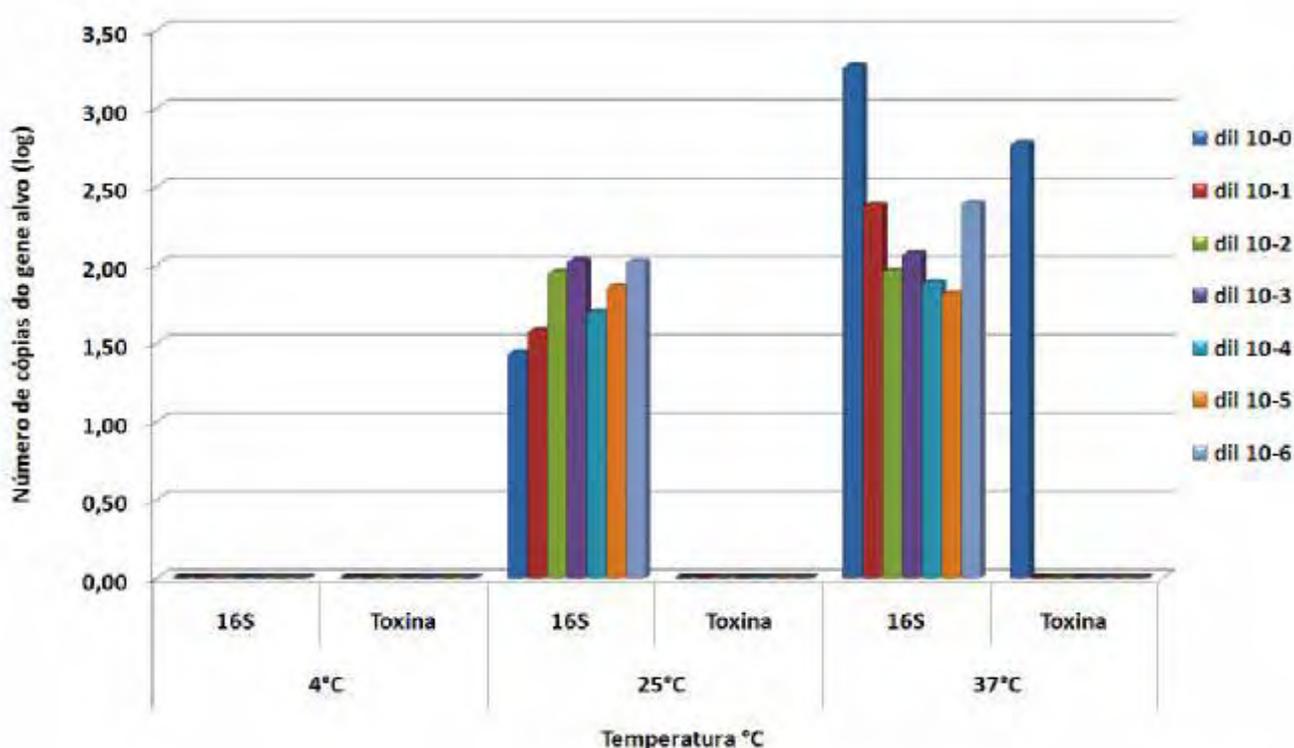
Em relação aos resultados da análise acima, os tratamentos mostraram a diferenciação do desenvolvimento do patógeno quando inoculado em amostras comerciais de palmito dos palmitos imersos em água peptonada (Gráfico 6).

Figura 6 – Diferenciação do desenvolvimento bacteriano e produção de toxina botulínica nos diferentes tratamentos. Jaboticabal/2007.



Nas amostras de palmito comercial foi possível detectar a expressão do gene BoNT/A apenas nas amostras armazenadas à 37°C, enquanto que nas amostras armazenadas em temperaturas de 4°C e 25°C apenas transcritos do gene 16S DNAr foram detectados. Adicionalmente, uma tendência de aumento no número de cópias de transcritos ribossomais foi observada com a elevação na temperatura de incubação de 25°C a 37°C quando comparado com incubação a 4°C, mostrando a importância da temperatura como fator para o desenvolvimento bacteriano. (Gráfico 7)

Figura 7 – Detecção do desenvolvimento bacteriano e produção de toxina botulínica nos palmitos comerciais submetidos a diferentes pHs e temperaturas pela técnica de PCR quantitativo. Jaboticabal/2007.

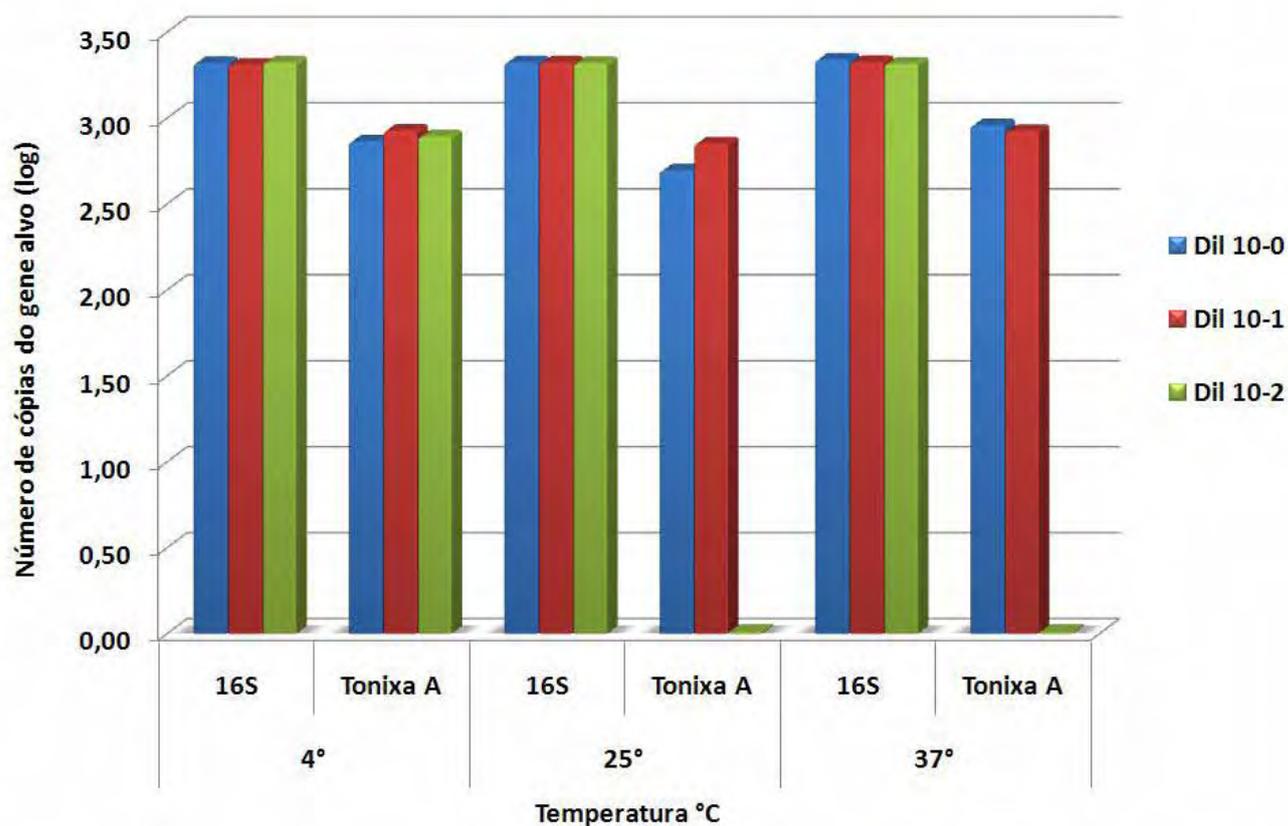


No tratamento onde os palmitos foram imersos em água peptonada, a expressão do gene envolvido na síntese da toxina botulínica ocorreu em todas as amostras. Os números de transcritos dos genes ribossomais e BoNT/A foram bastante similares dentre as temperaturas de incubação avaliadas (Gráfico 8). No trabalho descrito por SHIN et. al (2006) o RT-PCR quantitativo foi utilizado para analisar amostras de *C. botulinum* tipo A provenientes de diferentes fontes (lixão, solo, caso clínico e uma padrão ATCC), tendo sido observada uma amplificação idêntica em todas as amostras atingindo-se uma sensibilidade de detecção da

técnica a nível de expressão gênica em vários períodos de multiplicação bacteriana com bons resultados.

Considerando a relação entre o número de cópias de transcritos do gene 16S DNAr e do gene BoNT/A, foi possível observar que, em temperaturas de 37°C a expressão do gene BoNT/A representa uma maior porcentagem comparativamente a expressão do gene ribossomal.

Figura 8 – Detecção do desenvolvimento bacteriano e produção de toxina botulínica nos palmitos sem conservantes submetidos a diferentes pHs e temperaturas pela técnica de PCR quantitativo. Jaboticabal/2007.



### Comparação entre os métodos de bioensaio e PCR quantitativo

Comparando-se as duas técnicas obtemos como principal ponto a alta sensibilidade da técnica de PCR quantitativo, que detectou a expressão do gene BoNT/A, envolvido na síntese da toxina botulínica em um tratamento que não gerou morte de camundongos no teste do bioensaio. Este tratamento foi observado para as amostras de palmitos comerciais incubados em temperatura de 37°C. (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre as técnicas do bioensaio e PCR quantitativo

Técnica Utilizada	Palmito sem ácido*			Palmito comercial		
	Temperatura de Incubação			Temperatura de Incubação		
	4° C	25° C	37° C	4° C	25° C	37° C
bioensaio	+	+	+	-	-	-
qPCR	+	+	+	-	-	+

\* palmito sem conservantes, imersos em água peptonada.

O número de transcritos quantificados neste tratamento foi similar ao encontrado no tratamento com água peptonada incubado em mesma temperatura. Devido ao fato de os tratamentos de palmito comercial não terem causado morte de camundongos no bioensaio, pode se sugerir que tenha ocorrido a transcrição do gene, porém não ocorra a síntese da proteína resultante da expressão deste gene, ou que uma vez traduzida, a proteína esteja instável neste ambiente ácido naco causando botulismo. Em ambos os casos, a detecção da toxina por meio de métodos tradicionais como ELISA ou o bioensaio, fica comprometida, enquanto que o PCR quantitativo é capaz de detectar a atividade gênica do patógeno na amostra.

KIMURA et. al (2001) relataram o uso do PCR em tempo real para monitoramento em amostras de cultura pura de *Clostridium botulinum* tipo E e amostras de peixe embalado em atmosfera modificada contaminadas por *C. botulinum*, mostrando que o PCR quantitativo utilizando o sistema TaqMan de detecção é altamente sensível e sugerindo a sua utilização como um método rápido na avaliação do risco do botulismo nas amostras de peixe. No estudo realizado por FENICIA et. al (2007), utilizando a mesma técnica acima citada porém com reagente SYBRGreen, obtiveram positividade de 100% para *Clostridium botulinum* tipo A, onde, das 180 amostras testadas, apenas 79 eram confirmadas biologicamente quanto a tipagem.

A busca de técnicas sensíveis que possam substituir o teste de bioensaio em camundongos tem sido realizada por vários pesquisadores em diferentes países (Japão, Alaska, Estados Unidos, entre outros) (KIMURA et al., 2001).

O objetivo de se reduzir o uso de animais de laboratório para diagnóstico do botulismo tem sido considerado de grande importância pelas agências que estabelecem regulamentos de bem estar animal.

No caso do presente estudo, o PCR quantitativo mostrou-se como uma alternativa viável para o teste da presença de transcritos específicos da neurotoxina botulínica do tipo A em amostras de alimento. Resultado semelhante ao descrito por AKBULUT et. al (2004), onde foram analisadas oito amostras provenientes de casos suspeitos de botulismo, com detecção do gene da neurotoxina botulínica no material proveniente de 7 dos 8 casos, garantindo assim a eficácia do método e sugerindo a nova técnica para o uso público em casos suspeitos de botulismo humano, como nos processos de diagnósticos improváveis.

## CONCLUSÃO

1- O ambiente e a temperatura de armazenamento de amostras contendo células de *Clostridium botulinum* são altamente determinantes na expressão de genes envolvidos na síntese da toxina A.

2- A técnica de PCR quantitativo se mostrou altamente sensível na detecção da expressão do gene BoNT/A, sendo capaz de demonstrar a presença do patógeno e da expressão da toxina por meio da detecção do transcrito que codifica uma das proteínas envolvidas na síntese da toxina causadora do botulismo, o que não pode ser verificado com a técnica do bioensaio.

3- Pode-se aplicar a técnica de PCR quantitativo para detecção de toxina botulínica em alimentos.

## REFERÊNCIAS

AKBULUT, D.; GRANT, K. A.; McLAUHLIN, J. Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(9) :4342-8, 2005.

ANDO, Y. Studies on Germination of Spores of Clostridial Species Capable of Causing Food. Poisoning. I - Factors Affecting The Germination of Spore of *Clostridium botulinum* Type A in a Chemically Defined Medium. **Journal Food Society Japan**, v.14. p.457-462, 1973.

ARNON, S.S., **Human tetanus and human botulism**. In: The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. ROOD, J.I., McCLANE, B.A., SONGER J.G., TITBALL, R.W., Academic Press, California, Chapter 7: p. 95-115, 1997.

CATO, E.P., GEORGE, W.L., FINEGOLD, S.M., Genus Clostridium. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, ed. Williams and Wilkins, London, vol. 2, p. 1141-1200, 1986.

EDUARDO, M.B.P.; MALDALOSSO G., PAIVA, O.R., BRITO, S.N., ARAUJO E.S., BANDEIRA, C.R.S., ROWLANDS, R.E.G., RISTORI, C.A., JAKABI, M., **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: *Clostridium botulinum*/Botulismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002. 41p.

EDUARDO, M.B.P.; MALDALOSSO G., PAIVA, O.R., BRITO, S.N., ARAUJO E.S., BANDEIRA, C.R.S., ROWLANDS, R.E.G., RISTORI, C.A., JAKABI, M., Botulismo tipo A e B causado por torta comercial de frango com palmito e ervilhas no Município de São Paulo, **Boletim Epidemiológico Paulista**, Janeiro de 2007, vol. 4, n. 38, 2007.

FACH, P., HAUSER, D., GUILLOU, J.P., POPOFF, M.R. Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A and detection in food samples. **Journal Applied Bacteriology**, v.75, p.234-9, 1993.

FACH, P., GIBERT, M., GRIFFAIS, R., GUILLOU, J.P., POPOFF, M.R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.389-92, 1995.

FENICIA, L., ANNIBALLI F., De MEDICI D., DELIBATO E., AURELI, P. SYBR green real time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(9) :2891-6, 2007.

GELLI, D.S et al. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.44, n.6, p.321-321, 2002.

GRECZ, N., ANELLIS, A., SCHNEIDER, N.D., Procedure for cleaning of *Clostridium* spores. **Journal of Bacteriology**, 84:552-558, 1962.

HATHEWAY, C.L., FERREIRA, J.L. Detection and identification of *Clostridium botulinum* neurotoxins. In: SINGH, B.R., TU, A.T. (Eds). **Natural Toxins II**, Plenum Press, New York, p.481-98, 1996.

HIELM, S., HYYTIÄ, E., RIDELL, J., KORKEALA, H. Detection of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.357-65, 1996.

HOBBS, G. *Clostridium botulinum* and its Importance in Fishery Products. **Advances in Food Research**, v.22. p.135-185, 1976.

KIMURA, B., KAWASAKI, S., NAKANO, H., FUJII, T. Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.206-16, 2001.

KORKEALA, H., STENGEL, G., HYYTIÄ, E., VOGELSANG, B., BOHL, A., WIHLMAN, H., PAKKALA, P., HIELM, S. Type E botulism associated with vacuum-package hot-smoked whitefish. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.1-5, 1998.

McGRATH, S., DOOLEY, J.S.G., HAYLOCK, R.W. Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1423-8, 2000.

NOGVA, H.K., RUDI, K., NATERSTAD, K., HOLCK, A., LILLEHAUG, D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4266-71, 2000.

OLEKSIEWICZ, M.B., DONALDSON, A.I., ALEXANDERSEN, S. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. **Journal of Virological Methods**, v.92, p.23-35, 2001.

PIERSON, M.D., REDDY, N.R., *Clostridium botulinum*, **Food Tech.**, v.42, p. 196-198, 1988.

POLAQUINI, L.E.M. et al., Estudo de toxina botulínica e esporos de *Clostridium botulinum* em amostras de cama de frangos, coletadas em aviários. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora, MG, **Anais...**Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.48.

SANTIAGO, O. **Toxi-infecções produzidas por alimentos**. Brasília: Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal, DIPAC, Ministério da Agricultura, 1972, 276p.

SCHOCKEN-ITURRINO & YOKOYA. **Pesquisa de Clostridium botulinum e teste de inoculação em produtos carneos embalados a vácuo**. Tese de doutorado, Unicamp, 1980.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÁVILA, F. A. PINESE, J.E.; YOKOYA, F. "An Outbreak of Type "C" Botulism in Broiler chickens in São Paulo State, Brazil". **Review Microbiology**, São Paulo, 16 (1):31-35, 1985.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÁVILA, F.A.; BERCHIELLI, S.C.P.; HELLÚ, J.A.; FERNANDES, L .B.; GUINDOLIN ,F. R.; NADER FILHO, A. **Botulismo del Tipo A en Bovinos de la Raza Nelore en el Brasil**. na Integra nos Anales del XV CONGRESO MUNDIAL DE BUIATRIA (Palmas de Mallorca) Espanha,vol 1, p.820-825, 1988a .

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ÁVILA, F.A.; BERCHIELLI, S.C.P.; ROSSI JR., O.D.; NADER FILHO, A.; YOKOYA, F. "Isolation and characterization of Pathogenic *Clostridium* in Commercialized Meat Products". **ARS Veterinária**, 4 (1): 91-98, 1988b.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ÁVILA, F. A.; BERCHIELLI, S.C.P; NADER, F<sup>o</sup>.A. First case of Type A Botulism in Zebu (*Bos indicus*).**The Veterinary record**, London 126,n. 9 :217-218, 1990.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ÁVILA, F. A. Botulismo em Bovinos Confinados Provocado Pelo Consumo de Cama de Frangos Contaminada. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.43 (3). p.279 - 280, 1991.

SCIACCHITANO, C.J., HIRSHFIELD, I.N. Molecular detection of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin gene in smoked fish by polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. **Journal of AOAC International**, v.79, p.861-5, 1996.

SEGNER, W.P., SCHIMIDT, C. F., BOLTZ, J. K. Minimal Growth Temperature, Sodium Chloride Tolerance, pH Sensivity and Toxin Production of Marine and Terrestrial Strains of *Clostridium botulinum* Type C. **Applied Microbiology**, v.22. p.1025-1029, 1971.

SERRANO, A.M. Um provável surto de botulismo humano no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.1, n.2, p.16-19, 1982.

SHIN, N. R.; SHIN, J.H.; CHUN, J. H.; YOON, S. Y.; KIM, B. S.; OH, H. B.; RHIE, G. E. Determination of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type A by quantitative RT-PCR. **Molecules and Cells**. Vol. 22, n. 3, p 336-342, 2006.

SINGH, B.R. Intimate details of the most poisonous poison. **Nature Structural Biology**, v.7, p.617-9, 2000.

SMITH, L.S. **Botulism The Organism, Its Toxins, The Disease**, Ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, USA. p.236, 1977.

SZABO, E.A., PEMBERTON, J.M, DESMARCHELIER, P.M. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3011-20, 1993.

SZABO, E.A., PEMBERTON, J.M, GIBSON, A.M., EYLES, M.J., DESMARCHELIER, P.M. Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil and infant faeces. **Jounal Applied Bacteriology**, v.76, p.539-45, 1994.

TANASUGARN, L. *Clostridium botulinum* in the Gulf of Thailand. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37..194-197, 1979.

VITZTHUM, F., GEIGER G., BISSWANGER, H., BRUNNER, H. & BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence based microplate assay for the determination of double stranded DNA using SybrGreen I and a standard ultraviolettransilluminator gel imaging system. **Anal Biochemical** , 276(1):59-64, 1999.

WALTER LEDERMANN D.\* Historia del *Clostridium botulinum*. **Review Chilly Infect**, Ed. 39-41 2003;

WITCOME, M., NEWTON, K., JAMESON, D., HALLS, B., DUNNINGAN, 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3787-92, 1999.

YOON, S.Y., CHUNG, G.T., KANG, D.H, RYU, K.C, YOO, C.K, SEONG, W.K, Application of Real Time PCR for Quantitative Detection of *Clostridium botulinum* Type A Toxin Gene in **Food Microbiology Immunology.**, 49(6), 505-511, 2005.