

Ronnie Antunes de Assis

T636.083 69

A 848p

2001

**PADRONIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE  
CLOSTRIDIUM CHAUVOEI E CLOSTRIDIUM SEPTICUM E COMPARAÇÃO  
COM A IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina  
Veterinária

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte  
UFMG-Escola de Veterinária  
2001

A848p  
2001 Assis, Ronnie Antunes de, 1975-  
Padronização da imunohistoquímica para detecção de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* e comparação com a imunofluorescência direta / Ronnie Antunes de Assis. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

34p.: il.

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

1. *Clostridium* – Teses. 2. Imunofluorescência – Teses. 3. Imunohistoquímica – Teses. I. Título.

CDD – 616.931

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
24/01/02

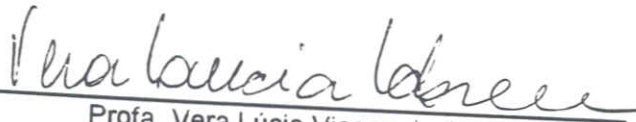
30102-07

0325-47960

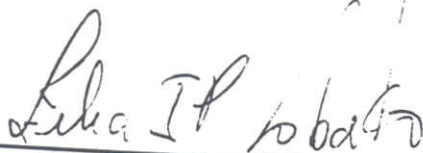
Dissertação defendida e aprovada em 29 de outubro de 2001 pela Comissão Examinadora constituída por:



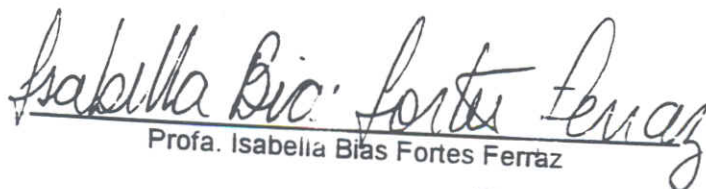
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Orientador



Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Profa. Zélia Inês Portela Lobato



Profa. Isabella Bías Fortes Ferraz



Profa. Rogéria Serakides

*Este trabalho é dedicado acima de tudo a Deus,  
meu guia.*

*Aos meus pais, por ter chegado aonde estou e  
principalmente por ter privado seus sonhos a  
favor dos meus.*

*Aos meus irmãos e familiares pela força e o  
amor que nos une.*

*A minha noiva Kelly, pela paciência, respeito,  
carinho e compreensão. Obrigado por tudo. Amo  
você.*

## AGRADECIMENTOS

Ao querido amigo Professor Francisco Lobato pela competente orientação, carinho, meu ingresso na vida científica, amizade, profissionalismo, preocupação com minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr Uzal (Paco) pela grandiosa oportunidade de estagiar no seu Laboratório, profissionalismo, carisma, amizade, minha instalação na Argentina e pela execução da técnica de imunohistoquímica.

Ao Amigo Nelson Éder por preocupar com minha pessoa em todos os sentidos

À Professora Vera Viegas pela transmissão de tranqüilidade, valorização pessoal e pelo grande apoio principalmente na fase final do trabalho.

À Professora Zélia Lobato pela gentileza, clareza científica e por estar sempre disposta a ajudar.

À Professora Isabella Ferraz pela grandiosa ajuda e valorização do trabalho

Aos Professores Rômulo e Livio Molina por me incentivarem a fazer o Mestrado.

Ao Colegiado de Pós Graduação na pessoa do Prof. Rômulo pela excelente assistência acadêmica, profissionalismo e relação de conforto que nos transmite.

À secretaria do DMVP pela colaboração nas horas necessárias.

Aos Profs Andrey e Maurílio pelo exemplo profissional e por estarem sempre prontos a ajudar.

Em especial ao Prof. Geovanni Dantas Cassali por me propiciar a primeira coloração imunohistoquímica no Laboratório do Prof. Vagner Tafuri.

À Professora Rogéria Serakides pelo exemplo profissional, competência, amizade, reconhecimento e pronta ajuda.

Aos amigos de trabalho Ricardo Aurélio e João Diniz Maia pela amizade, apoio e ajuda profissional.

A Ângela M. J. Ferreira e suas auxiliares Rejane e Eliziane do Laboratório de imunoquímica do LARA-PL pela técnica de purificação de imunoglobulinas e disposição em ajudar.

Aos Amigos do LARA-PL: Massami, Pedro Mota, Ronaldo Sanches, Anapolino, Ernani, Aládio, Jaqueline pelo apoio e amizade e ao Dr Aquino Porfírio pela concessão de realizar parte do experimento nas dependências do LARA-PL.

Ao Prof. Nelson Rodrigo pela paciência e pela constante disponibilidade

Aos demais professores do DMVP e da EV-UFMG pela ajuda na hora necessária.

Aos queridos companheiros de trabalho do Laboratório de Anaeróbios da EV/UFMG pelo grande apoio, incentivo, valorização pessoal, respeito e excelente convívio, em especial a Lili por ter sido meu braço direito na execução deste trabalho e a Patrícia Parreiras pela lealdade e força espiritual.

Aos queridos amigos funcionários do DMVP: Ricardo Canesso, André, Toninho, Wendel, Jorge, Júnia, Creuza, Doraci, Joãozinho, Aílton, Ismael, Cláudio, Eduardo, Ângela, Luciana, Renata, pela valiosa colaboração e principalmente pela convivência prazerosa.

À Nádia pela formatação final da dissertação.

À Sra Elma Vidál do INTA/Bariloche pela excelente assistência técnica, generosidade e carinho.

Às funcionárias da Patologia Marilene e Mel pela preciosa colaboração

Aos queridos amigos do INTA/Bariloche: Winston Morris, Mariano, Raúl Cabrera, Silvana Petray, Jorge Layana, Bete, Teresita, Giraudo-Pacha, Silva, Pablo, Joaquin pelos preciosos momentos de convivência.

Ao querido Prof. Ivan Sampaio pela ajuda, amizade, exemplo profissional e pelas belíssimas aulas de estatística.

Ao PRPq pelo apoio financeiro deste projeto e ao CNPq por meu apoio financeiro

Ao irmão Fabiano Sant'Anna pela amizade, ajuda e principalmente por termos aprendido muitas coisas juntos.

Aos queridos companheiros de luta de Pós-Graduação pelos momentos que passamos juntos, em especial, Marcelo Camargos, Géder (gaúcho), Bete Reis, Cristiano, Ricardo Leite, Cid, Gláucia, Janildo, Paulo Cristo, César, José Augusto, Cícero, Ricardo, Rogério (baiano), Luís Gustavo, Marco Túlio, Robertinho, Tarcísio, Leonardo Leite pela prazerosa convivência.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

"Tudo tem o seu tempo"

"Todas as coisas têm o seu tempo, e todas elas passam debaixo do céu segundo o tempo que a cada um foi prescrito. Há tempo de nascer, e tempo de morrer. Há tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou. Há tempo de matar, e tempo de sarar. Há tempo de destruir, e tempo de edificar. Há tempo de chorar, e tempo de rir. Há tempo de espalhar pedras, e de as ajuntar. Há tempo de dar abraços e afastar deles. Há tempo de adquirir, e tempo de perder. Há tempo de guardar, e tempo de lançar fora. Há tempo de amor, e tempo de ódio. Há tempo de guerra, e tempo de paz"

Eclesiastes 3, 1-8

---

"Estou imbuído de duas profundas impressões; a primeira, que a Ciência não conhece países; a segunda, que a Ciência é a mais alta personificação de uma nação. A Ciência não conhece país, porque o conhecimento pertence à humanidade, e ela é a tocha que ilumina o mundo. A Ciência é a mais alta personificação de uma nação porque a primeira dentre as nações será aquela que levar mais longe os trabalhos do pensamento e da inteligência." "Tomem interesse, eu lhes imploro, naquelas sagradas instituições que designamos sob o expressivo nome de laboratórios. Peçam que elas sejam multiplicadas e adornadas; eles são os templos da riqueza e do futuro. Lá é que a humanidade cresce, torna-se mais forte e melhor. Lá ela aprende a ler nos trabalhos da Natureza, símbolos do progresso e da harmonia universal, enquanto que os trabalhos do ser humano são freqüentemente aqueles do fanatismo e da destruição." "Jovens, tenham fé nos métodos eficientes e seguros dos quais ainda não conhecemos todos os segredos. E, qualquer que seja vossa carreira, não vos deixeis desancorajar pela tristeza de certas horas que passam sobre as nações. Vivam na paz serena dos laboratórios e bibliotecas..."

(Pasteur)

In: Pasteur e a Ciência Moderna – René Dubos

---

"Procedei varonilmente, e tende coragem; não temais nem vos atemorizeis à vista deles, porque o Senhor teu Deus é ele mesmo o teu guia, e não te deixará, nem te desampará".

Deuteronômio 31,6

---

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. LITERATURA CONSULTADA .....	15
2.1. Considerações gerais sobre <i>Clostridium chauvoei</i> e <i>Clostridium septicum</i> .....	15
2.2. Aspectos filogenéticos entre <i>Clostridium chauvoei</i> e <i>Clostridium septicum</i> .....	16
2.3. Diagnóstico pela imunofluorescência direta .....	16
2.4. Considerações gerais sobre os métodos imunohistoquímicos .....	17
2.4.1. Diagnóstico pela imunohistoquímica .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Animais .....	19
3.2. Amostras de referência dos clostrídios .....	19
3.3. Inoculação em cobaias e coleta e preparo das amostras de tecidos .....	19
3.4. Produção de soro hiperimune anti- <i>Clostridium chauvoei</i> e anti- <i>Clostridium septicum</i> .....	20
3.5. Preparo dos conjugados para imunofluorescência direta .....	20
3.6. Processamento do material para a técnica de imunohistoquímica .....	21
3.6.1. Controle positivo .....	22
3.6.2. Diluição de trabalho do anticorpo primário .....	22
3.6.3. Avaliação do tempo de incubação dos cortes com o anticorpo primário .....	22
3.7. Análise estatística .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5. CONCLUSÕES .....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela1- Resultados da imunofluorescência direta e imunohistoquímica empregando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) para animais inoculados e não inoculados com <i>Clostridium chauvoei</i> .....	25
Tabela2- Resultados da imunofluorescência direta e imunohistoquímica empregando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) para animais inoculados e não inoculados com <i>Clostridium septicum</i> .....	25

---



---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Principais técnicas de imunoperoxidase.....	17
Figura 2. <i>Clostridium septicum</i> marcado em impressão de tecido muscular de cobaio inoculado experimentalmente, imunofluorescência direta, 500x.....	27
Figura 3. Músculo da área de inoculação de <i>Clostridium septicum</i> com substituição do anticorpo primário por soro normal de coelho (controle negativo), estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 500x .....	27
Figura 4. <i>Clostridium septicum</i> imunomarcado no interistício e no interior das fibras do músculo da área de inoculação de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 625x .....	27
Figura 5. <i>Clostridium chauvoei</i> imunomarcado na parede do vaso do miocárdio de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 500x.....	27
Figura 6. Aglomerados de <i>Clostridium septicum</i> imunomarcados na região periportal do fígado de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 375x .....	29
Figura 7. <i>Clostridium septicum</i> imunomarcado na polpa vermelha do baço de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 550x.....	29
Figura 8. <i>Clostridium septicum</i> imunomarcado no interistício e no interior de vasos do córtex renal de um cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 625x .....	29

---

## RESUMO

Padronizou-se a técnica da imunohistoquímica empregando o complexo imunoenzimático streptavidina-biotina marcada (LSAB) para detectar *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* e comparou-se a mesma com a técnica de imunofluorescência direta (IFD), usando diferentes tecidos de cobaias inoculados experimentalmente com *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A. Seções e impressões de músculo do ponto de inoculação, coração, fígado, baço e rim, foram obtidas para a LSAB e IFD, respectivamente. Soro hiperimune anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foram produzidos em coelhos e purificados em coluna de DEAE-celulose. Partes das imunoglobulinas foram conjugadas com isotiocianato de fluoresceína e o restante foi utilizada na técnica de LSAB. Os conjugados anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* apresentaram títulos de 256 e 512, respectivamente, enquanto o anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foram padronizados na diluição de 1:2000/15 minutos e 1:4000/40 minutos de incubação, respectivamente. Não foram observadas reações cruzadas entre os anticorpos avaliados e nenhuma das outras espécies de clostrídios utilizadas. *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* foram detectados em todas as seções e impressões de tecidos pelas técnicas de LSAB e IFD. A técnica de LSAB desenvolvida neste estudo, mostrou-se eficiente para detectar *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* em tecidos de cobaias fixados pelo formol e incluídos em parafina, e apresentou 100% de sensibilidade e especificidade em relação à IFD.

*Palavras-chave:* *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, imunofluorescência direta, imunohistoquímica (LSAB)

## ABSTRACT

Immunohistochemistry using the streptavidin biotin complex (LSAB) was standardized to detect *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in different tissues of guinea-pigs inoculated experimentally with *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* type A and *Clostridium perfringens* type A. LSAB was compared to a fluorescent antibody technique (FAT). Sections and impressions of muscle from the inoculation point, heart, liver, spleen and kidney, were obtained for both LSAB and FAT analysis. Anti-*Clostridium chauvoei* and anti-*Clostridium septicum* hyperimmune serum were produced in rabbits and purified in a column of DEAE-cellulose. Aliquots of the immunoglobulins were conjugated with fluorescein isothiocyanate and the remaining was used for LSAB. The anti-*Clostridium chauvoei* and anti-*Clostridium septicum* conjugates had titles of 256 and 512, respectively, while the primary antibodies anti-*C. chauvoei* and anti-*C. septicum* were standardized in the dilution of 1:2000 and 1:4000, respectively. Cross reactions were not observed between the specific antibodies and none of the other species of *Clostridium* tested. *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* were detected in all the sections and impressions of tissues by both FAT and LSAB techniques. The LSAB technique developed in this study was efficient for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of guinea-pigs, and had 100% sensibility and specificity when compared to FAT.

*Key words:* *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, fluorescent antibody technique, immunohistochemistry (LSAB)

## 1. INTRODUÇÃO

O carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa são enfermidades resultantes da multiplicação e produção de toxinas por bactérias do gênero *Clostridium* na musculatura de bovinos, ovinos e caprinos principalmente, com conseqüente lesão local e toxemia. O carbúnculo sintomático é causado principalmente pelo *Clostridium chauvoei*, enquanto a gangrena gasosa, é causada por *Clostridium septicum*, e em menor freqüência por *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium novyi* tipo A. Vários fatores tais como intervenções cirúrgicas, traumas, isquemias vasculares, tumores e outras infecções bacterianas aeróbias e/ou anaeróbias podem desencadear estas infecções. Estes fatores propiciam diminuição do oxigênio, reduzindo o potencial de óxido-redução nos tecidos, favorecendo a germinação dos esporos aí localizados e a conseqüente produção de toxinas (Sterne & Batty, 1975).

Os prejuízos econômicos advindos destas enfermidades são difíceis de serem avaliados em razão da escassez de dados disponíveis, entretanto, devido a alta letalidade estima-se que estes sejam altos (Baldassi et al., 1985). No Brasil, durante o período de 1970-1979, em 2082 materiais suspeitos enviados ao Instituto Biológico de São Paulo, foram encontrados 10,45% de amostras positivas para *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* (Baldassi et al., 1985). Em Minas Gerais, o carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa atingiram o maior índice de mortalidade entre as doenças infecciosas de bovinos nos anos de 1982 a 1986, o terceiro maior índice em 1987 e o segundo de 1988 a 1989 (Brasil, 1982-1989). No mesmo Estado, no período de 1990 a abril de 1999, foram registrados segundo o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 8098 focos de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa com 7623 óbitos (Solange Olinda, comunicação pessoal)<sup>1</sup>.

Apesar do número de focos e de animais afetados ser elevado, a maior parte do diagnóstico é baseado apenas em dados clínicos e/ou lesões de necropsia. O isolamento bacteriológico normalmente requer procedimentos demorados, dispendiosos e pessoal treinado. A diferenciação entre *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* é difícil devido à similaridade dos caracteres morfológicos e de reações bioquímicas. O diagnóstico baseado na inoculação de animais de laboratório é por sua vez, inconclusivo (Sterne, 1977; Levett, 1991). Outro fator refere-se ao fato de *Clostridium septicum* superar o crescimento de *Clostridium chauvoei* em meio sólido dificultando o isolamento do mesmo (Kuhnert et al., 1997). A imunofluorescência direta (IFD) como método de diagnóstico tem sido utilizada mundialmente (Batty & Walker, 1963; Pinto & Abreu, 1992) sendo considerada uma prova segura e rápida para diferenciação e identificação de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* em impressões de tecidos. Entretanto, requer para sua execução microscópio especial, anticorpos marcados, material fresco ou especialmente processado. Além disso, a decomposição ou contaminação dos tecidos com outros microorganismos dificulta o isolamento e até mesmo a utilização do teste de imunofluorescência.

Uma alternativa para o diagnóstico dessas enfermidades é a utilização da imunohistoquímica (IHQ), que ao combinar técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, permite localizar os componentes tissulares definidos "in situ" mediante o emprego de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (Gimeno, 1995). Esta técnica tem sido empregada na identificação de diferentes microrganismos em esfregaços e cortes de tecidos, apresentando vantagens em relação aos métodos bacteriológicos e de imunofluorescência, por permitir a utilização de amostras fixadas em formol.

<sup>1</sup> Serviço de Sanidade Animal - SSA/DFAMG

O objetivo deste trabalho foi padronizar o teste imunohistoquímico empregando o complexo imunoenzimático streptavidina-biotina marcada (LSAB) para detecção de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, bem como comparar o mesmo com a técnica de IFD, usando diferentes tecidos de cobaios infectados experimentalmente com esses microrganismos.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1. Considerações gerais sobre *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*

#### *Clostridium chauvoei*

*Clostridium chauvoei*, descrito por Arloing, Cornevin e Thomas em 1887 (Cato et al., 1986) é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito, móvel, formador de esporos e produtor das toxinas, alfa (hemolítica, necrotizante e letal), beta (DNase), gama (hialuronidase) e delta (hemolisina). A toxina alfa, por sua ação, é considerada a principal toxina envolvida na patogenia do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa. O agente está amplamente distribuído no solo e trato intestinal de herbívoros (Gyles, 1993). A sobrevivência do microrganismo no solo sob a forma de esporos é o fator mais significativo para a transmissão aos animais, pois a ingestão de pastos contaminados com esporos se constitui na principal via de transmissão para os animais. O agente causa doença específica (carbúnculo sintomático) em bovinos, bem como infecções de feridas em bovinos, ovinos, suínos e ocasionalmente em eqüinos (Sterne, 1981). O carbúnculo sintomático é o resultado da ativação de esporos latentes de *Clostridium chauvoei* depositados no músculo após transporte na circulação a partir do intestino, possivelmente veiculados por macrófagos (Gyles, 1993). Bovinos jovens, entre quatro meses e três anos de idade no mais alto patamar nutricional são os mais susceptíveis. Traumas nas grandes massas musculares desses animais criam um ambiente de baixa tensão de oxigênio molecular e do potencial de óxido-redução local, propiciando a germinação dos

esporos e a conseqüente produção de toxina (Sterne & Batty, 1975). A lesão é acompanhada por edema, hemorragia e necrose miofibrilar exalando acentuado odor rançoso. Clinicamente o animal apresenta temperatura elevada, anorexia e depressão, quando o membro é atingido, manqueira é observada. O local torna-se edematoso e à palpação, é observada crepitação decorrente das bolhas de gás produzidas pela multiplicação da bactéria (Hateway, 1990). A evolução para morte ocorre em até 48 horas. Outra forma de carbúnculo sintomático não muito comumente encontrada é o carbúnculo sintomático visceral, afetando principalmente o miocárdio; e tem sido descrita como causa de morte súbita em cordeiros (Glastonbury et al., 1988) e em bovinos (Helman et al., 1997).

#### *Clostridium septicum*

*Clostridium septicum* foi descrito por Macé em 1889 (Cato et al., 1986). O microrganismo apresenta habitat e morfologia semelhante a *Clostridium chauvoei*, e constitui uma importante causa de infecção de feridas em bovinos. Ovinos, suínos e eqüinos também podem ser infectados, porém mais raramente (Smith, 1984). A gangrena gasosa pode ser causada pela ação de uma ou mais das seguintes toxinas produzidas pelo microrganismo: alfa toxina, com a mesma ação da alfa toxina produzida pelo *Clostridium chauvoei*, porém são antigênicamente diferentes (Ballard et al., 1992), beta (deóxidoribunuclease), gama (hemolisina) e delta (hialuronidase). Os fatores predisponentes e o desencadeamento do processo patológico são os mesmos descritos para o carbúnculo sintomático. A sintomatologia clínica inclui febre, anorexia, taquicardia e depressão, mas ocorre toxemia que faz com que o quadro evolua para a morte em algumas horas ou dias. As lesões são similares às da manqueira; edema crepitante nos músculos e tecidos subcutâneos que inicialmente é quente e dolorido e com a evolução da doença se torna frio e indolor. Além disso, é comum a ocorrência de hemorragia e necrose (Hateway, 1990). Uma condição

particular de ovinos e determinada por *Clostridium septicum*, é uma enfermidade denominada "Braxy" ("Bradsot"). Tal afecção é caracterizada por injúrias da parede do abomaso em decorrência da ingestão de pastagens congeladas que favorecem a infecção pelo *Clostridium septicum* e o desencadeamento do processo (Jungherr & Welch., 1927; Smith, 1984; Gyles., 1993). A enfermidade em ovinos tem limitada importância econômica devido à baixa prevalência e restrita distribuição geográfica (Eustis & Bergeland, 1981).

Em determinadas condições, o isolamento de *Clostridium septicum* em um tecido, não necessariamente é uma evidência absoluta que o microrganismo foi o causador da infecção. *Clostridium septicum* está presente no intestino da maioria dos ruminantes, a partir do qual invade rapidamente o restante da carcaça após a morte. Conseqüentemente, não é incomum recuperar *Clostridium septicum* de uma variedade de tecidos tomados um ou mais dias após a morte dos animais, mesmo quando é quase certo que *Clostridium septicum* não tenha sido o causador da morte (Smith, 1984).

Em relação às medidas aplicadas para o controle e profilaxia das enfermidades causadas por *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, verifica-se que embora sejam sensíveis à penicilina e antibióticos de amplo espectro, estes são de pouco ou nenhum valor para o tratamento dessas enfermidades, pois em geral os animais são encontrados mortos ou em estado agônico. Portanto, as medidas gerais se restringem a cuidados de manejo e na administração sistemática de imunógenos (Lobato & Assis, 2000).

## 2.2 Aspectos filogenéticos do *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*

Desde os mais antigos até os recentes trabalhos envolvendo *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* mencionam que estes agentes são difíceis de serem distinguidos em razão da alta similaridade existente entre eles. Este fator tem

contribuído para a ocorrência de reações cruzadas em provas imunológicas (Pinto, 1992) e moleculares (Khunert et al., 1997), tornando em geral necessária, a adoção de procedimentos que buscam a eliminação de tais reações como a adsorção (Pinto, 1992) e o emprego de enzimas de restrição (Khunert et al., 1997). Tal similaridade foi bem determinada em um estudo molecular filogenético desenvolvido por Khunert et al (1996) baseado na seqüência gênica da região codificadora da sub-unidade 16S rDNA. O estudo envolveu outros clostrídios além de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* e revelou que 99,3% da seqüência gênica de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* é idêntica.

## 2.3 Diagnóstico pela imunofluorescência direta

Batty & Walker (1963) utilizaram a técnica de IFD para diferenciação de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. Suspensões bacterianas mortas foram inoculadas por via endovenosa em coelhos em oito doses intervaladas de três dias. As três primeiras inoculações foram de 0,5, 1,0 e 1,5 mL e as cinco subseqüentes de 2,0 mL. A sangria final foi realizada sete dias após a última inoculação. Os títulos aglutinantes foram da ordem de 1:320. A conjugação foi realizada com isotiocianato de fluoresceína, após precipitação das globulinas com rivanol e sulfato de amônio. O excesso de fluoresceína foi removido utilizando-se coluna de Sephadex e diálise a 4°C, por um período de dois a três dias, frente a 0,15M de tampão fosfato pH 7,2. O material examinado constituiu-se de esfregaços dos microorganismos, impressões e cortes congelados de músculos de cobaias infectados. Os conjugados não apresentaram reações cruzadas, corando por conseguinte apenas as amostras homólogas.

Danescu et al (1978) utilizaram a técnica de IFD para identificação de espécies de *Clostridium*. As concentrações protéicas encontradas, após precipitação com sulfato de amônio e diálise dos soros, foram de 1,08 a 1,74 g/100 mL. Para a conjugação, realizada por 18 a 20 horas a 4°C, foi

utilizado isotiocianato de fluoresceína na concentração de 1:20 (50µg por mg de proteína) e o fluorocromo não conjugado foi retirado por filtração em gel com Sephadex G-25. As lâminas coradas demonstraram resultados satisfatórios e específicos, não sendo observada fluorescência em esfregaços de cultura de *Clostridium chauvoei* corados com conjugado de *Clostridium septicum*.

Pinto & Abreu (1992), produziram e avaliaram conjugados anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* para a técnica de IFD. Os antígenos foram inoculados por via intradérmica, tendo sido feitas cinco inoculações intervaladas de sete dias. Todas as inoculações com exceção da última foram feitas com adjuvante completo de Freund. Os títulos aglutinantes foram da ordem de 1:800. As imunoglobulinas foram fracionadas por dois métodos: 1. com sulfato de amônio. 2. com ácido caprílico e sulfato de amônio. As concentrações protéicas do soro imune anti-*Clostridium chauvoei* após precipitação com sulfato de amônio e sulfato de amônio/ácido caprílico foram de 1,23 e 1,94 g/100mL respectivamente, e para o soro anti-*Clostridium septicum* de 1,48 e 1,76g/100 mL respectivamente. A conjugação foi

realizada com 25 µg de isotiocianato de fluoresceína por mg de proteína. Os conjugados cujos soros foram precipitados com sulfato de amônio apresentaram título 20. Aqueles obtidos a partir da precipitação com sulfato de amônio/ácido caprílico apresentaram título 160. Em razão da ocorrência de reações cruzadas, os conjugados foram adsorvidos com antígenos heterólogos, e após a realização deste procedimento, os títulos dos conjugados preparados a partir de soros precipitados com ácido caprílico foram de 40.

#### 2.4. Considerações gerais sobre os métodos imunohistoquímicos

A utilização das técnicas de imunoperoxidase teve início com a aplicação do método direto. Posteriormente foram desenvolvidas técnicas mais rápidas e eficientes, como: método indireto; método do anticorpo ponte; método da peroxidase-anti-peroxidase (PAP); método da avidina-biotina; método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Fig.1); método do complexo streptavidina-biotina marcada (LSAB) e método do polímero marcado (Gimeno, 1995).

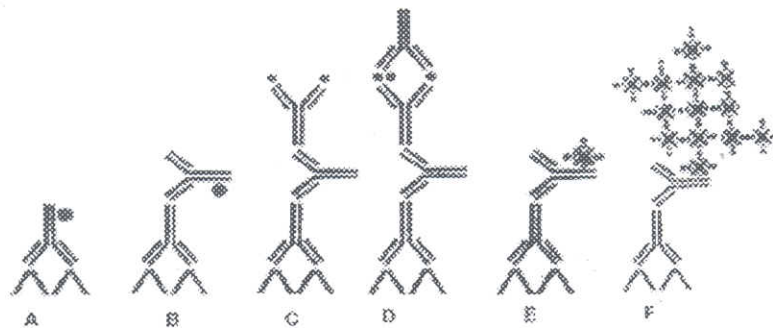


Figura 1. Principais técnicas de imunoperoxidase. A - Método direto. B - Método indireto. C - Método do anticorpo ponte. D - Método da peroxidase-anti-peroxidase (PAP). E - Método da avidina-biotina. F - Método do complexo avidina-biotina (ABC). Símbolos: Antígeno (W), anticorpo (Y), peroxidase (●), complexo avidina-biotina-peroxidase (A-B-●). Adaptado de Gimeno (1995).

O método da streptavidina-biotina marcada (LSAB) possui uma grande vantagem em relação aos que utilizam moléculas de avidina. A avidina tem a tendência de unir-se de forma inespecífica a membranas celulares, ácidos nucleicos e grânulos de mastócitos devido ao alto ponto isoelétrico. Este inconveniente tem sido contornado pela utilização da streptavidina, uma proteína do *Streptomyces avidinii*, que possui afinidade pela biotina equivalente à da avidina da clara do ovo e menor tendência a unir-se a elementos celulares, devido ao fato de não ser glicosada e possuir ponto isoelétrico próximo do neutro. Este método consiste na incubação inicial com o anticorpo primário, seguido do anticorpo biotilado e posteriormente por uma solução de streptavidina marcada com peroxidase. É considerada 4 a 8 vezes mais sensível que a técnica ABC, sendo ainda mais rápida, além de poder ser utilizada indistintamente com soro monoclonal primário de camundongo e policlonal de coelho, já que o anticorpo secundário é uma mescla de IgG anti-camundongo e anti-coelho (Haines & Clarck, 1991; Gimeno, 1995). O método LSAB só é superado pelo método do polímero marcado (Gimeno, 1995).

#### 2.4.1. Diagnóstico pela imunohistoquímica

Conesa et al., 1995 empregaram a técnica de PAP para detecção de *Clostridium chauvoei* em tecidos de ovinos fixados em formol e incluídos em parafina. Soro hiperimune foi produzido em coelhos mediante inoculação dos animais por via endovenosa; tendo sido feitas oito inoculações intervaladas de três dias. As quatro primeiras inoculações do antígeno foram de 1, 2, 3 e 4 mL e as quatro subseqüentes de 5 mL. O soro hiperimune não foi purificado. Cinco animais foram inoculados por via intramuscular na coxa direita com 5 mL de cultura pura de *Clostridium chauvoei* (ATCC 10092) juntamente com 5 mL de solução estéril de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 10% e outros cinco animais utilizados como controle, foram inoculados da mesma forma com

apenas 5 mL de  $\text{CaCl}_2$  10%. Os animais foram sacrificados 18 horas após a inoculação quando já apresentavam sintomas clínicos. Amostras do tecido subcutâneo, músculo do ponto de inoculação, fígado, baço e rim foram tomadas para bacteriologia anaeróbica e coloração de Gram. Amostras dos mesmos tecidos e uma amostra de miocárdio, foram fixadas em formol e incluídas em parafina. A diluição de 1:400 e o tempo de incubação em overnight a 4°C, foram determinadas como as melhores condições para o emprego do soro anti-*Clostridium chauvoei* na técnica de PAP. Apenas seções de músculo do ponto de inoculação por serem as únicas que apresentaram consistentemente bastonetes por meio da técnica de hematoxilina eosina (HE) foram processadas pela técnica de PAP e todas as amostras foram positivas pela técnica.

Vanelli & Uzal, 1996 empregaram a técnica de PAP para detecção de *Clostridium septicum* em tecidos de ovinos fixados em formol e incluídos em parafina. Soro hiperimune foi produzido em coelhos mediante inoculação dos animais por via endovenosa; tendo sido feitas oito inoculações intervaladas de três dias. As quatro primeiras inoculações do antígeno foram de 1, 2, 3 e 4 mL e as quatro subseqüentes de 5 mL. O soro hiperimune não foi purificado. Cinco animais foram inoculados por via intramuscular na coxa direita com 5 mL de cultura pura de *Clostridium septicum* (ATCC 12464) juntamente com 5 mL de solução estéril de  $\text{CaCl}_2$  a 10% e outros cinco animais utilizados como controle, foram inoculados da mesma forma com apenas 5 mL de  $\text{CaCl}_2$  10%. Os animais foram sacrificados 18 horas após a inoculação quando já apresentavam sintomas clínicos. Amostras do músculo do ponto de inoculação foram tomadas para bacteriologia anaeróbica, coloração de Gram e processadas para a técnica de PAP. A diluição de 1:1000 e o tempo de incubação em overnight a 4°C, foram determinadas como as melhores condições para o emprego do soro anti-*Clostridium septicum* na técnica de PAP. Nestas condições, todas as cinco amostras

de músculo do ponto de inoculação de *Clostridium septicum* foram positivas pela técnica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG, Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento em Pedro Leopoldo (LARA-PL) e Laboratório de Patologia e Microbiologia do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária em San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina (EEA-INTA/Bariloche).

#### 3.1. Animais

Foram utilizados seis coelhos machos da raça Nova Zelândia<sup>2</sup> pesando entre 2,5 e 3,0 Kg para produção de soro hiperimune e setenta cobaios da cepa English Short Ear<sup>3</sup> de ambos os sexos pesando entre 350 a 500g para a inoculação experimental das amostras de clostrídios. Os coelhos foram alojados em gaiolas suspensas e receberam arraçoamento apropriado diário e água foi fornecida à vontade. Os cobaios foram mantidos em cubas plásticas com piso coberto com maravalha e também foi ministrada ração adequada e água à vontade.

#### 3.2. Amostras de referência dos clostrídios

Para a inoculação em animais susceptíveis e para produção de soros hiperimunes, foram utilizadas amostras da American Type Culture Collection (ATCC)<sup>4</sup> de *Clostridium chauvoei* (ATCC10092) e *Clostridium septicum* (ATCC 12464).

Para verificação da especificidade foram utilizadas as amostras de *Clostridium*

*chauvoei* (ATCC10092) e *Clostridium septicum* (ATCC 12464), *Clostridium sordellii* (ATCC-9714), *Clostridium novyi* tipo A (ATCC-19402) e *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC-3624).

As amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1 mL de caldo tioglicolato<sup>5</sup> e semeadas em dois tubos de ensaio (16x160mm) com tampa de rosca contendo 10 mL de meio tioglicolato e em duas placas de ágar sangue. Os dois tubos e uma placa foram incubados em anaerobiose a 37°C por 48 horas, e a outra placa foi deixada em aerobiose. As amostras foram avaliadas quanto a pureza pela coloração de Gram. Para manutenção, as amostras foram subcultivadas em caldo tioglicolato e posteriormente liofilizadas.

A patogenicidade das amostras foi verificada pela inoculação intramuscular, em cobaios, de 0,5 mL de cultura de cada agente adicionada a 0,5 mL de solução estéril de CaCl<sub>2</sub> a 10%<sup>6</sup>, sendo utilizado dois animais por amostra. Os animais foram observados até o aparecimento dos sintomas quando foram sacrificados e necropsiados. Impressões de músculo e fígado foram coradas pela técnica de Gram para confirmação da morfologia típica das amostras.

#### 3.3. Inoculação em cobaios e coleta e preparo das amostras de tecidos

Empregou-se 60 cobaios, divididos em seis grupos de 10 animais. Os grupos de 1 a 5 foram inoculados da mesma forma descrita anteriormente com culturas das amostras de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A, respectivamente. O grupo 06 (controle), foi inoculado pela mesma via com 1,0 mL de solução estéril de CaCl<sub>2</sub> a 10% (Shapton & Board, 1971). Os animais foram observados até o aparecimento dos sintomas quando foram sacrificados e necropsiados. De cada um dos animais inoculados, foram coletados

<sup>2</sup> Fazenda Experimental Hélio Barbosa da EV/UFMG, Igarapé-MG

<sup>3</sup> Laboratório Regional de Apoio Animal - LARA-PL

<sup>4</sup> Rockville, Maryland, USA

<sup>5</sup> Dignolab, Barcelona, Espanha

<sup>6</sup> Reagen - Quimibras Indústrias Químicas S.A



os seguintes espécimes: músculo do ponto de inoculação, miocárdio, fígado, baço e rim. De cada espécime foram feitas quatro impressões, sendo duas fixadas com acetona anidra (Pinto, 1992) para a técnica de IFD, e duas fixadas pelo calor (Batty & Walker, 1963) para avaliação da morfologia pelo método de Gram num total de 600 lâminas para cada técnica, sendo que 300 foram utilizadas para a leitura e 300 reservadas para eventuais repetições; perfazendo 50 observações para cada grupo inoculado. Fragmentos dos mesmos tecidos de aproximadamente 0,5 x 1,5 x 1 cm de espessura, após serem identificados individualmente, foram fixados em formalina neutra tamponada a 10%, pH 7,2-7,4 durante 24 horas, e em seguida processados pelo método de inclusão em parafina, cortados a cinco micrômetros de espessura (Luna, 1968); sendo 10 seções do músculo do ponto de inoculação e duas dos demais espécimes clínicos num total de 1080 cortes para a padronização e avaliação da técnica de imunohistoquímica.

#### **3.4. Produção de soro hiperimune anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum***

As amostras bacterianas inicialmente cultivadas em caldo tioglicolato foram repicadas em caldo "cook meat medium" (CMM)<sup>7</sup> e incubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento adequado, verificado pela produção de gás, cada amostra foi repicada em caldo "tryptic soy broth" (TSB)<sup>8</sup> e incubada a 37°C por 18 horas em anaerobiose. Após constatação de formas vegetativas e pureza das amostras, as culturas foram centrifugadas a 1000 x g, a 4°C, durante 30 minutos e o sobrenadante descartado. Os precipitados foram lavados cinco vezes em solução estéril de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 com 0,5% de formol e ressuspendidos na mesma solução a uma concentração equivalente ao tubo sete da escala de Mac Farland (Bier, 1985), com concentração aproximada de  $2,1 \times 10^9$  células/mL. As suspensões foram mantidas a 37°C por 24 horas. Após controle de

esterilidade em caldo cérebro-coração e placas de ágar sangue a 37°C por 48 horas em anaerobiose, parte das suspensões bacterianas foram emulsionadas com adjuvante completo de Freund na proporção de 1:1 para inoculação nos animais. Suspensões não emulsionadas foram mantidas a 4°C para serem utilizadas como antígeno na detecção de anticorpos (Pinto, 1992).

As emulsões foram inoculadas em coelhos, sendo utilizados três animais por amostra. O volume de antígeno inoculado por animal/dia foi de 0,4 mL, sendo realizadas quatro aplicações intradérmicas de 0,1 mL em quatro sítios diferentes no dorso dos animais. Foram feitas aplicações nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 42 num total de seis aplicações.

No dia 35 obteve-se uma amostra de sangue dos coelhos por punção na veia marginal da orelha para se determinar a presença de anticorpos anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* pelo método de aglutinação em placa. Para o teste foram misturados uma gota do antígeno utilizado nos inóculos com uma gota de diluições crescentes do soro (entre 1/100 e 1/12800) sobre uma placa de vidro. As leituras foram realizadas depois de movimentos suaves de rotação por dois minutos, considerando o resultado positivo quando neste tempo obteve-se aglutinação macroscópica (Pinto, 1992).

No dia 57, depois de realizar o mesmo procedimento descrito no dia 35, realizou-se sangria total dos animais por punção cardíaca. Após coagulação à temperatura ambiente por duas horas e retração do coágulo por 14-18 horas a 4°C, os soros foram centrifugados a 1000 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e mantidos a -20°C até seu uso.

#### **3.5. Preparo dos conjugados para imunofluorescência direta**

As imunoglobulinas foram obtidas por precipitação dos soros imunes com solução saturada de sulfato de amônio (Goldman, 1968), diálise em tampão fosfato pH 7,2

<sup>7</sup> Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra

<sup>8</sup> Merck, Darmstadt, West Germany

(PBS) (Pinto & Abreu, 1992) e passagem em coluna de DEAE/celulose com 4 cm de diâmetro, equilibrada e eluída com Tris/HCL pH 8,8. As dosagens protéicas foram realizadas em espectrofotômetro<sup>9</sup> a 560 nm de absorvância pelo método do biureto e comparadas a uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA)<sup>10</sup> na concentração de 10 mg/mL (Ângela M. J. Ferreira, comunicação pessoal)<sup>11</sup>.

Após determinada a concentração protéica, parte das imunoglobulinas foram conjugadas à temperatura de 4°C. O restante de imunoglobulinas não conjugadas foi guardado a -20°C para serem usadas como anticorpo primário na técnica de imunohistoquímica. Para a conjugação, isotiocianato de fluoresceína (FITC)<sup>12</sup> na proporção de 25µg para cada mg de proteína (Wood et al., 1965) foi colocado em um erlenmeyer. Ao mesmo foi adicionado, gota a gota, 10% de tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,5. Após cinco minutos sob agitação com barra magnética, adicionou-se cada um dos soros a serem conjugados e deixou-se sob agitação por 18 horas.

Os conjugados foram passados em coluna de Sephadex G-50<sup>13</sup> com 1 cm de diâmetro, equilibrada e eluída com PBS pH 7,2 para separação das frações não conjugadas. As frações obtidas dos conjugados foram diluídas com glicerol na proporção de 1:1 e mantidos a -20°C até seu uso (Pinto, 1992).

Os conjugados foram titulados em esfregaços de cultivo de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, utilizando-se diluições crescentes, entre 1:2 e 1:16384. Os conjugados foram diluídos com solução a 2% de Tween 80 em PBS pH 7,2. Selecionou-se a maior diluição dos conjugados que produziu fluorescência dos microrganismos com mínima coloração de fundo. A especificidade foi testada em

esfregaços de cultivo de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A. Na diluição de trabalho dos conjugados, repetiu-se por 20 vezes o procedimento utilizado para avaliação com o intuito de certificar a diluição padronizada dos mesmos.

Após titulação, corou-se as lâminas contendo as impressões de tecidos dos animais inoculados, para comparação com a técnica de imunohistoquímica.

Lâminas contendo esfregaços de cultivos e impressões de tecidos secas à temperatura ambiente por período de 30 minutos e fixadas em acetona anidra a -18°C por 30 minutos, foram cobertas com as diluições dos conjugados e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas rapidamente com PBS pH 7,2, imersas em PBS durante 15 minutos e enxaguadas em água destilada. A seguir, foram contracoradas com solução a 0,005% de azul de Evans em PBS pH 7,2 por 10 minutos, enxaguadas por três vezes em PBS pH 7,2 e montadas com glicerol ajustado ao pH 7,2 com PBS (Pinto, 1992). Para visualização foi empregado Microscópio Zeiss, binocular, "Standard WL"<sup>14</sup>, objetiva de imersão 100X com diafragma, ocular 10X, condensador de campo escuro a óleo, filtro excitador VG-2, filtros de barreira 0/41 e iluminação com lâmpadas de mercúrio HBD-200 Osram.

### 3.6. Processamento do material para a técnica de imunohistoquímica

Os cortes dos tecidos obtidos foram montados em lâminas previamente tratadas e incubadas em estufa a 56°C durante 15 minutos.

Após lavagem com água destilada, as lâminas foram imersas por 30 minutos numa solução contendo 10 g de gelatina<sup>15</sup> e 1 g de alúmen crômio<sup>16</sup> diluídos em 2000 mL de água destilada. Após o tratamento, as

<sup>9</sup> Shimadzu corporation UV 160A

<sup>10</sup> Sigma, St. Louis, USA

<sup>11</sup> Laboratório Regional de Apoio Animal -LARA-PL

<sup>12</sup> Sigma, St. Louis, USA

<sup>13</sup> Sigma, St. Louis, USA

<sup>14</sup> CARL ZEISS, Companhia Ótica e Mecânica Oberkochen, Alemanha Ocidental

<sup>15</sup> Difco Laboratories

<sup>16</sup> Merck, Darmstadt, West Germany

lâminas foram retiradas da água destilada e secas ao ar à temperatura ambiente (G.D.Cassali, comunicação pessoal)<sup>17</sup>. Para a imunomarcagem dos cortes histológicos, utilizou-se a técnica da estreptavidina biotina marcada (LSAB) conforme a metodologia descrita por Uzal (1993). Lâminas contendo seções histológicas de animais inoculados com as amostras dos clostrídios e dos animais controle foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 1% em PBS durante 20 minutos em câmara úmida a 37°C para bloqueio da peroxidase endógena e com BSA a 2% em PBS durante 15 minutos em câmara úmida a 37°C para o bloqueio de aderências inespecíficas. Os cortes histológicos foram cobertos com o anticorpo primário (IgG de coelho anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum*) e paralelamente com soro normal de coelho em diferentes diluições e tempos de incubação, conforme explicitado nos itens 3.6.2 e 3.6.3. A seguir, foram cobertos com soro secundário, anti-IgG de coelho e camundongo<sup>18</sup>, incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e posteriormente com o conjugado estreptavidina peroxidase<sup>18</sup> em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. As etapas acima foram intercaladas com três lavagens em PBS de cinco minutos cada. Para revelação dos complexos imunes, foi utilizado o cromógeno (3,3 tetrahidrocloroto diaminobenzidina-DAB<sup>19</sup>), controlando o tempo de imunomarcagem ao microscópio óptico, o qual era de um a três minutos. Os cortes histológicos foram finalmente contracolorados com hematoxilina de Harris (Luna, 1968) por 20 segundos e visualizados ao microscópio óptico.

### 3.6.1 Controle positivo

Para avaliação dos anticorpos primários anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foram empregados cortes do

<sup>17</sup> Laboratório de Patologia Geral – ICB/UFMG

<sup>18</sup> Large Volume Dako LSAB 2 kit peroxidase universal K675 Dako Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA

<sup>19</sup> Peroxidase substrate kit DAB SK-4100, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010

músculo do ponto de inoculação de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A, previamente certificados quanto a presença de bactérias pelas colorações de hematoxilina-eosina e “Maccallum goodpasture” (Luna, 1968).

### 3.6.2. Diluição de trabalho do anticorpo primário

Para determinar a sensibilidade dos anticorpos primários, cortes histológicos sabidamente positivos de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* foram processadas utilizando-se as seguintes diluições dos anticorpos primários anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum*: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000. Selecionou-se a mais alta diluição que permitiu obter uma melhor imunomarcagem do antígeno com coloração de fundo inexpressiva. Uma vez determinada a sensibilidade, os soros foram testados na diluição eleita em seções positivas para *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A e em seções do músculo do ponto de inoculação dos animais controle para avaliação da especificidade. Paralelamente, outras seções provenientes dos mesmos tecidos foram testadas da mesma maneira com soro normal de coelho obtido anteriormente à imunização destes animais, como forma de controle dos anticorpos primários.

### 3.6.3. Avaliação do tempo de incubação dos cortes com o anticorpo primário.

Anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e soro normal de coelho no lugar do anticorpo primário, foram testados em 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente e por 12 horas em câmara úmida à 4°C. Anticorpo primário anti-*Clostridium septicum* e soro normal de coelho no lugar do anticorpo primário, foram testados em 20 minutos, 40 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente e por 12 horas em câmara úmida à 4°C. Escolheu-se o tempo

de incubação que proporcionou uma melhor imunomarcção em seções positivas para *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* com coloração de fundo inexpressiva.

### 3.7. Análise estatística

Os resultados de comparação das técnicas de IFD e LSAB obtidos a partir dos espécimes clínicos dos animais inoculados com *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* e dos animais controle foram analisados pelo teste do  $\chi^2$  segundo Sampaio (1998). Para cada técnica, foi lida 1 lâmina/espécime clínico/animal inoculado, totalizando 50 observações para cada um de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* e os animais controle.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação das amostras, houve crescimento bacteriano somente em anaerobiose, bem como foram vistos ao Gram apenas bastonetes Gram positivos, confirmando a pureza das amostras utilizadas.

Todas as amostras inoculadas foram patogênicas para os animais. O aparecimento de sintomas clínicos ocorreu entre 18 e 36 horas após a inoculação. A área ao redor do ponto de inoculação apresentou coloração violácea, bem como estava tumefeita, quente e crepitante. À necropsia, foram observados edema muscular e subcutâneo intenso, coloração vermelho-enebecida e formação de bolhas de gás entre as fibras musculares. Por meio da coloração de Gram, observou-se bastonetes Gram positivos nas impressões de músculo e fígado obtidos dos cobaios inoculados, confirmando a morfologia típica das amostras.

O período de crescimento das culturas de 18 horas também foi utilizado por Shirasaka & Benno (1982), sendo um período maior que os usados por Henderson (1934) e Batty & Walker (1963). Pinto & Abreu (1992), relatam que em virtude do abundante crescimento bacteriano ocorrido no período de 18 horas, o tempo de incubação das culturas para obtenção das

formas vegetativas poderia ter sido menor, o mesmo foi observado neste trabalho. Claus & Macheak (1972) sugeriram o período de crescimento máximo de oito horas. A concentração de antígeno utilizada, de acordo com Bier (1985) correspondendo ao tubo sete da Escala de Mac Farland, também utilizada por Pinto & Abreu (1992), mostrou-se eficiente para obtenção do soro imune, embora inferior às concentrações dos antígenos utilizados por Henderson (1934) e Batty & Walker (1963).

As inoculações no dorso dos animais com suspensões emulsionadas com adjuvante completo de Freund mostraram-se eficientes para obtenção dos soros imunes, porém originaram severas lesões na área ao redor das inoculações.

Na sangria realizada no dia 35, os títulos obtidos para os soros anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foram de 1:200 e 1:400 ao teste de aglutinação, respectivamente. Aos 57 dias, obteve-se aglutinação até a diluição de 1:1600 para o soro anti-*Clostridium chauvoei* e 1:3200 para o soro anti-*Clostridium septicum*, resultados superiores aos encontrados por Batty & Walker (1963); Danescu et al (1978) e Pinto & Abreu (1992).

A técnica de precipitação das imunoglobulinas com sulfato de amônio e purificação em coluna de DEAE/celulose mostrou-se eficiente. As concentrações de imunoglobulinas obtidas depois da precipitação dos soros imunes com sulfato de amônio foram de 2,97 e 9,8 g/100 mL para os soros anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum*, respectivamente, enquanto as concentrações de IgG conjugadas com isotiocianato de fluoresceína foram de 2,15 e 5,5g/100 mL para os soros contra estes dois microrganismos, respectivamente mostrando-se também superiores aos obtidos por Danescu et al (1978) e Pinto & Abreu (1992).

As diluições ideais de trabalho dos conjugados anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foram de 1:256 e 1:512, respectivamente. Reações cruzadas não foram observadas entre os conjugados

e nenhuma das outras espécies de clostrídios utilizadas. Nas 20 repetições da diluição padronizada dos conjugados anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum*, obteve-se o mesmo resultado observado anteriormente, no qual apenas esfregaços de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* foram imunomarcados com a mesma intensidade de fluorescência. Pinto & Abreu (1992), compararam dois métodos de precipitação de soros imunes, por sulfato de amônio e por ácido caprílico/sulfato de amônio, e concluíram que os conjugados preparados a partir de soros purificados com ácido caprílico/sulfato de amônio apresentaram melhores títulos que os precipitados somente com sulfato de amônio. Neste trabalho foi utilizada somente a precipitação dos soros imunes com sulfato de amônio e os resultados apresentados pelos conjugados foram superiores aos obtidos por Pinto & Abreu (1992), considerando a titulação e o fato que nesse trabalho, os conjugados anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* apresentaram reação cruzada fazendo-se necessário a adsorção dos mesmos. A obtenção de maiores títulos dos conjugados neste trabalho pode ter sido em razão do esquema de imunização dos animais, no qual foi utilizado um maior número de inoculações com adjuvante completo de Freund, bem como a técnica de precipitação e purificação das imunoglobulinas em coluna de DEAE/celulose ter sido mais eficiente que a usada por Pinto & Abreu (1992). É provável que os altos títulos dos conjugados tenham favorecido a não ocorrência de reações cruzadas. Goldman (1968) indica o uso da coluna de DEAE/celulose para se evitarem colorações inespecíficas e Pinto & Abreu (1992) relata que os resultados obtidos com o emprego desta coluna não mostraram satisfatórios, por ocasionarem quedas acentuadas nas concentrações protéicas.

Bastonetes Gram positivos foram observados em todas as impressões dos espécimes clínicos obtidos dos animais inoculados com as amostras. As lâminas provenientes dos animais controle foram negativas.

*Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* foram detectados na diluição de trabalho

dos conjugados, em todas as impressões dos espécimes clínicos provenientes das cobaias inoculadas com esses microrganismos pela técnica de IFD (Fig.2), apresentando marcação específica intensa. Quando os conjugados foram aplicados sobre as impressões de tecidos provenientes dos animais inoculados apenas com o  $\text{CaCl}_2$  estéril a 10% ou quando aplicados nas impressões dos animais inoculados com *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A, nenhuma coloração foi observada.

Para a técnica da LSAB o anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* foi padronizado na diluição de 1:2000 e 1:4000 e tempo de incubação de 15 e 40 minutos, respectivamente, resultados superiores aos encontrados por Conesa et al., 1995 e Vanelli & Uzal, 1996, considerando o maior título do anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* e o tempo de incubação mais reduzido dos mesmos. Reações cruzadas não foram observadas entre os anticorpos avaliados e com as demais espécies de clostrídios utilizadas. Quando os anticorpos primários foram testados nos cortes de tecido provenientes dos animais controle ou quando foram substituídos por soro normal de coelho (Fig.3), nenhuma marcação de bastonetes foi observada. Conforme mencionado anteriormente, *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* são espécies muito relacionadas, apresentando 99,3% de similaridade o que dificulta a padronização dos testes de diagnóstico em relação à ocorrência de reações cruzadas. Neste trabalho, durante a padronização do anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum* para a técnica de imunohistoquímica, quando foram testadas diluições mais baixas que as padronizadas, (até 1:1000), os anticorpos primários apresentaram reações cruzadas entre-si e foi necessário realizar a adsorção dos mesmos para eliminar essas reações (dados não mostrados), porém com o intuito de eliminar tais reações bem como evitar o processo de adsorção, trabalhou-se com dois parâmetros: aumento da diluição e diminuição do tempo de incubação dos anticorpos primários; e dessa maneira foi

possível eliminar as reações cruzadas e conseqüentemente a necessidade do processo de adsorção nas diluições de 1:2000 e 1:4000 com o tempo de incubação de 15 minutos e 40 minutos para o anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei* e anti-*Clostridium septicum*, respectivamente.

*Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* foram detectados na diluição de trabalho do anticorpo primário em todas as seções dos espécimes clínicos provenientes de todas as cobaias inoculadas com esses microrganismos pela técnica de LSAB, apresentando marcação específica intensa. Marcação imunohistoquímica não foi observada nas seções dos espécimes

clínicos provenientes dos cobaias inoculados com as demais espécies de clostrídios e dos animais controle.

A ausência de imunomarcção nas seções de tecidos do músculo do ponto de inoculação utilizando anticorpos contra as outras espécies de clostrídios confirma a especificidade dos anticorpos primários nas diluições empregadas na técnica de LSAB, demonstrando mais uma vez, que a técnica utilizada para a preparação dos soros imunes foi adequada. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a técnica de LSAB mostrou 100% de sensibilidade e especificidade em relação à IFD, não havendo portanto diferenças estatísticas entre as técnicas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Resultados dos testes de imunofluorescência direta e de imunohistoquímica empregando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) nas seções histológicas de animais inoculados e não inoculados com *Clostridium chauvoei*

Animal	Imunofluorescência direta					LSAB				
	MPI*	Fígado	Miocárdio	Baço	Rim	MPI*	Fígado	Miocárdio	Baço	Rim
1 a 10 <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 a 20 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n=50

\* músculo do ponto de inoculação

<sup>1</sup> inoculados

<sup>2</sup> controle negativo - inoculados apenas com CaCl<sub>2</sub> a 10%

+: todas as 10 seções de cada espécime dos 10 animais inoculados com *Clostridium chauvoei* foram positivas para o agente em ambas as técnicas

-: todas as 10 seções de cada espécime dos 10 animais inoculados somente com CaCl<sub>2</sub> a 10% foram negativas para ambas as técnicas quando aplicado o conjugado e o anticorpo primário anti-*Clostridium chauvoei*

Tabela 2. Resultados dos testes de imunofluorescência direta e de imunohistoquímica empregando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) para animais inoculados e não inoculados com *Clostridium septicum*

Animal	Imunofluorescência direta					LSAB				
	MPI*	Fígado	Miocárdio	Baço	Rim	MPI*	Fígado	Miocárdio	Baço	Rim
1 a 10 <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 a 20 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n=50

\* músculo do ponto de inoculação

<sup>1</sup> inoculados

<sup>2</sup> controle negativo - inoculados apenas com CaCl<sub>2</sub> a 10%

+: todas as 10 seções de cada espécime clínico dos 10 animais inoculados com *Clostridium septicum* foram positivas para o agente em ambas as técnicas.

-: todas as 10 seções de cada espécime dos 10 animais inoculados somente com CaCl<sub>2</sub> a 10% foram negativas para ambas as técnicas quando aplicado o conjugado e o anticorpo primário anti-*Clostridium septicum*.

BIBLIOTECA-ESCOLA VETERINARIA DA UFPA

Analisando as seções de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* coradas pela LSAB, verificou-se que ambos os agentes apresentaram o mesmo padrão de distribuição e a mesma intensidade de imunomarcacão em todos os órgãos examinados, porém de forma geral, foi visualizada maior quantidade de bastonetes em seções provenientes dos animais inoculados com *Clostridium septicum* em relação às provenientes da inoculação de *Clostridium chauvoei*. Isto provavelmente ocorreu devido ao fato de *Clostridium septicum* ser considerado mais invasivo em relação a *Clostridium chauvoei* (Sterne, 1981; Smith, 1984). Outro fato claramente observado como uma regra geral neste estudo para *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* quando analisados separadamente, foi que nas seções do músculo do ponto de inoculação havia grande quantidade de bastonetes e à medida que as seções dos demais órgãos eram examinadas, verificava-se que a quantidade de bastonetes presentes ia diminuindo bruscamente em relação ao

músculo do ponto de inoculação. Apesar do caráter invasivo destes microrganismos, eles têm que vencer as barreiras e distâncias impostas durante seu trajeto pelo organismo. Este fator também atesta mais uma vez a eficiência da LSAB desenvolvida neste estudo, no qual mesmo quando havia uma quantidade relativamente pequena de bastonetes nos diferentes órgãos estudados, os mesmos eram identificados pela técnica. No músculo do ponto de inoculação observou-se presença difusa de bastonetes tanto no interstício quanto no interior das fibras (Fig.4) e vasos. No miocárdio os bastonetes foram evidenciados dentro de vasos (Fig.5) e por entre as fibras musculares, distribuídos difusamente pelo corte histológico. No fígado, a imunomarcacão foi observada no interstício da área periportal (Fig.6) e centrolobular. No baço foram observados focos de bastonetes situados principalmente no interstício da polpa vermelha (Fig.7). No rim havia a presença de vários focos de bastonetes no interstício e no interior de vasos do córtex (Fig.8) e região medular.

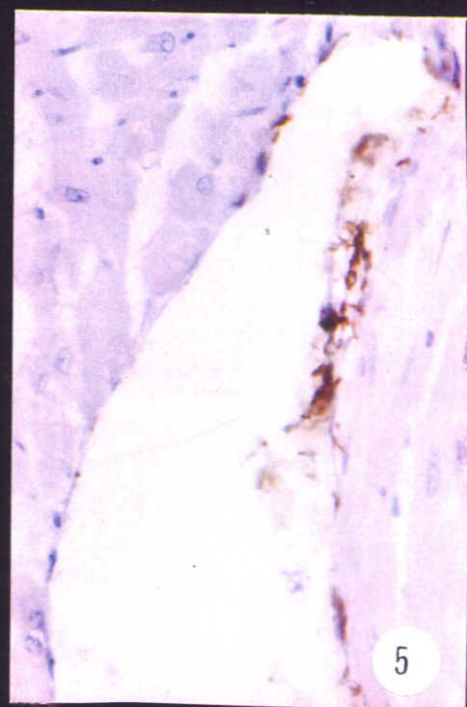
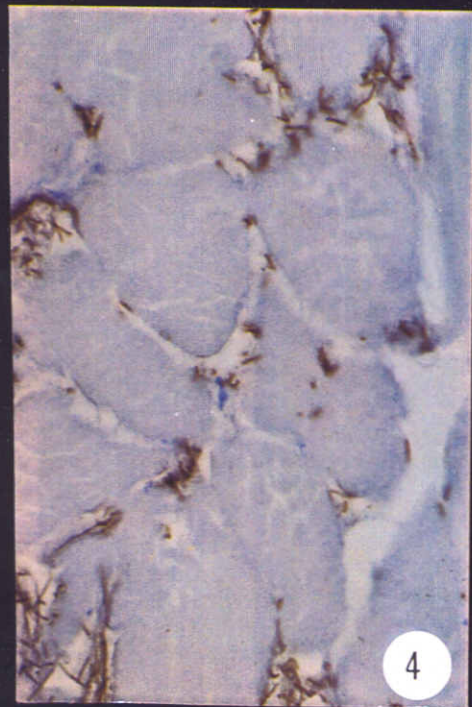
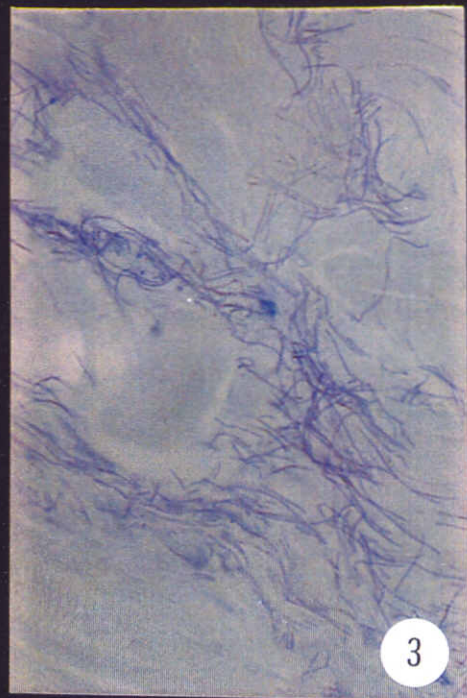
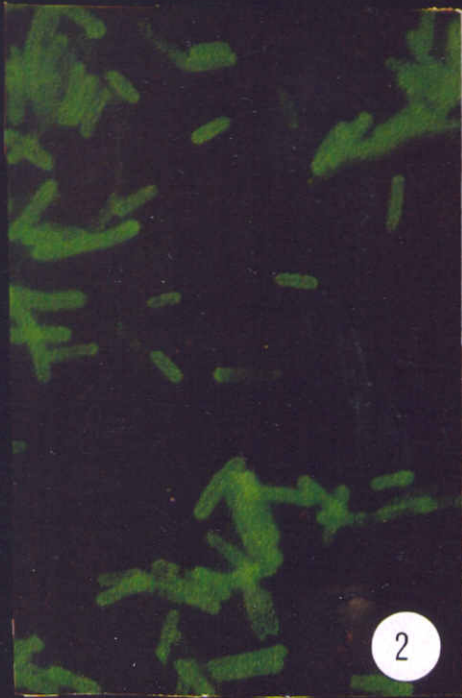
#### Legenda das Figuras 2, 3, 4 e 5

Figura 2. *Clostridium septicum* marcado em impressão de tecido muscular de cobaio inoculado experimentalmente, imunofluorescência direta, 500x

Figura 3. Músculo da área de inoculação de *Clostridium septicum* com substituição do anticorpo primário por soro normal de coelho (controle negativo), estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 500x .

Figura 4. *Clostridium septicum* imunomarcado no interstício e no interior das fibras do músculo da área de inoculação de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 625x

Figura 5. *Clostridium chauvoei* imunomarcado na parede do vaso do miocárdio de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 500x



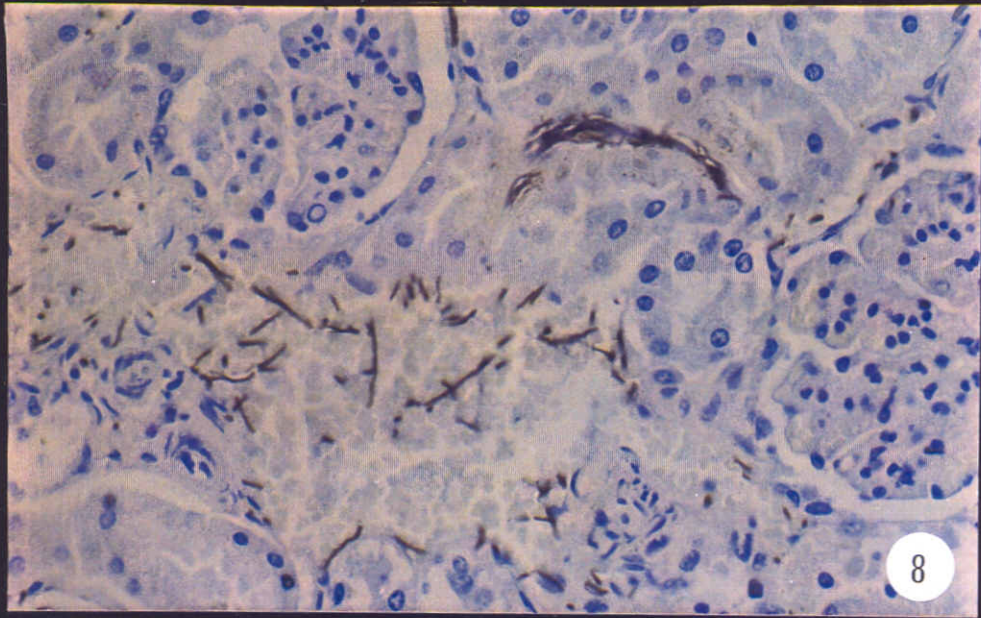
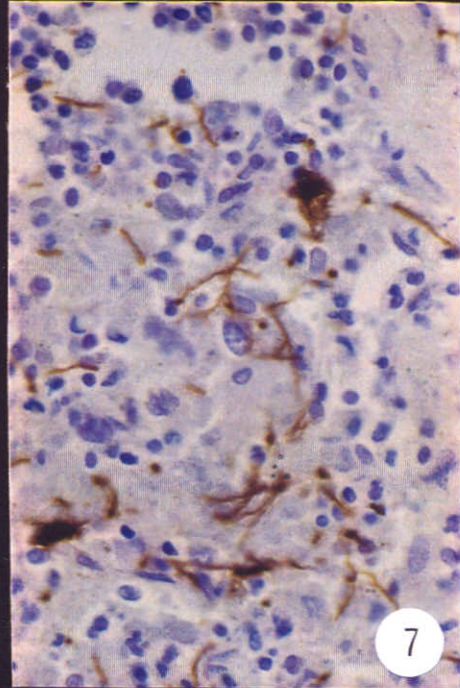
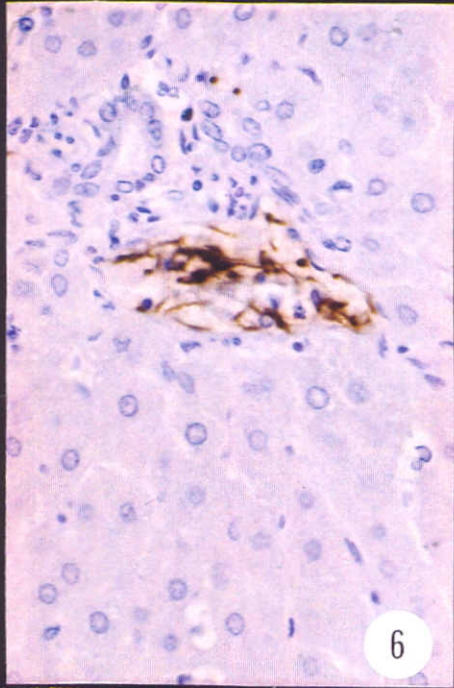


#### Legenda das Figuras 6, 7 e 8

Figura 6. Aglomerados de *Clostridium septicum* imunomarcados na região periportal do fígado de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 375x

Figura 7. *Clostridium septicum* imunomarcado na polpa vermelha do baço de cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 550x

Figura 8. *Clostridium septicum* imunomarcado no interstício e no interior de vasos do córtex renal de um cobaio inoculado experimentalmente, estreptavidina biotina marcada (LSAB). Contraste: hematoxilina de Harris, 625x



As seções do músculo do ponto de inoculação particularmente, apresentaram marcação imunohistoquímica entre e no interior das fibras musculares. Estes resultados contrastam com trabalhos realizados previamente, utilizando a técnica de PAP em tecidos de cordeiros inoculados experimentalmente (Conesa et al., 1995; Vanelli & Uzal, 1996), nos quais foram observadas marcações somente entre as fibras musculares. É provável que as essas diferenças observadas neste trabalho tenham ocorrido pelo fato do anticorpo utilizado ter sido purificado, e a técnica de LSAB ser mais sensível que a técnica de PAP (Gimeno, 1995). Outro fator que diferiu dos trabalhos desenvolvidos anteriormente, diz respeito à metodologia empregada para a produção e purificação dos soros imunes, que permitiu o emprego de diluições mais altas dos anticorpos primários, bem como o reduzido tempo de incubação.

A semelhança dos resultados obtidos com as técnicas de IFD e LSAB reforçam mais uma vez que a detecção desses agentes em tecidos parafinizados é mais uma alternativa eficaz. Na prática veterinária de campo, onde a necropsia é uma ferramenta de diagnóstico de uso rotineiro é comum obter amostras frescas para cultivo bacteriológico e amostras em formol para exame histopatológico. A capacidade da LSAB de detectar microrganismos em material fixado em formol, permite o envio de uma só amostra com duplo objetivo; de exame histopatológico e detecção de microrganismos (Uzal, 1993).

O material de eleição para diagnóstico do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa é principalmente o músculo esquelético afetado e para eventuais casos de carbúnculo sintomático visceral, o miocárdio. A presença de bastonetes em outros órgãos observados pela técnica de LSAB sugere que provavelmente outros órgãos poderiam ser utilizados para o diagnóstico do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa, e não apenas a área muscular lesionada.

Um diagnóstico presuntivo do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa, é usualmente baseado em sinais clínicos e achados de necropsia, enquanto um diagnóstico definitivo poderia ser obtido pelo cultivo dos agentes envolvidos. Entretanto, os clostrídios envolvidos nessas enfermidades, são nutricionalmente muito exigentes e o cultivo deles consome muito tempo, além de necessitar-se de pessoal treinado e da aquisição de meios de cultura relativamente onerosos (Sterne & Batty, 1975). Alternativamente, um método de diagnóstico em uso para esses microrganismos é a IFD. A técnica tem sido habitualmente empregada para esfregaços de cultivo, claps e seções congeladas de tecidos afetados (Batty & Walker, 1963, Van Kampen & Kennedy, 1968, Power et al., 1987, Buxton & Donachie, 1991, Pinto & Abreu, 1992). Entretanto, o material deve ser fresco ou especialmente condicionado, os preparados podem ser conservados por poucas horas e a morfologia tissular é pobre (Taylor, 1978, Haines & Clarck, 1991). A técnica de LSAB padronizada neste estudo parece ser a primeira desenvolvida para a detecção de clostrídios e foi tão eficiente quanto a técnica de IFD para detectar *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. A LSAB se constitui em um método simples, rápido e barato para identificar especificamente *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* em tecidos fixados pelo formol e incluídos em parafina e portanto, poderia também ser um complemento para o diagnóstico definitivo do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa, especialmente onde as facilidades laboratoriais para o cultivo de anaeróbios não estão prontamente disponíveis, e principalmente quando materiais suspeitos de gangrena gasosa e carbúnculo sintomático são encaminhados de fazendas ou demais localidades distantes dos centros de diagnóstico que muitas vezes, já chegam em condições impróprias para o diagnóstico. Está técnica também permite a realização de estudos retrospectivos.

Apesar dos significativos prejuízos econômicos ocasionados pela alta letalidade do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa, são poucos os casos notificados destas enfermidades com confirmação laboratorial, sendo a maioria deles baseados somente em dados clínicos e/ou lesões de necropsia. Isto ocorre principalmente devido às complicações na obtenção, envio e processamento das amostras ao laboratório, bem como devido à escassez de laboratórios que realizam o diagnóstico de enfermidades clostridiais. Com o emprego das técnicas de IFD e IHQ será possível melhorar o diagnóstico, o que por sua vez, aumentará as possibilidades de determinar a real prevalência do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa em nosso meio, informação que por sua vez, será de utilidade para a tomada de decisões em relação à fabricação e ao uso de vacinas contra estas enfermidades.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com o presente trabalho conclui-se que:

- O método imunohistoquímico utilizando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) mostrou-se eficiente para a detecção de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* em tecidos de cobaias fixados pelo formol e incluídos em parafina, sendo portanto recomendável a sua implementação à rotina de diagnóstico.
- A técnica da streptavidina biotina marcada (LSAB) mostrou 100% de sensibilidade e especificidade em relação à IFD.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BATTY, I; WALKER, PD. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by use of fluorescent labelled antibodies. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v.85, n.2, p.517-520, 1963.

BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 23.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1982. Técnicas bacteriológicas.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Delegacia Federal de Agricultura em Minas Gerais. *Relatório de atividades – SERSA/MG*. 1982-1989, v.1-8, n.1-8.

BUXTON, D; DONACHIE, W. Clostridial diseases. In: MARTIN, WB, AITKEN, P. (Eds), *Diseases of sheep*. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991. p.104-114.

CATO, EP; GEORGE, WL; FINEGOLD, SM. Genus *Clostridium*, In: SNEATH, P (Ed). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1141-1182.

CLAUS, KD; MACHEAK, ME. Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. *American Journal of Veterinary Research*, v.33, n.5, p.1045-1052, 1972.

CONESA, LCG; VANNELI, SA; UZAL, FA. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. *Veterinary Research Communications*, v.19, n.6, p.451-456, 1995.

- DANESCU, A; CIRSTET, I; TOMA, AN. Identificarea si tipizarea unor germeni anaerobi patogeni din genul *Clostridium* prin anticorpi fluorescenti. *Lucrarile Institutului de Cercatari Veterinare si Biopreparate "Pasteur"*, v.14, p.175-186, 1978.
- EUSTIS, SL; BERGELAND, ME. Suppurative abomasitis associated with *Clostridium septicum* infection. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 178, n.7, p.732-734, 1981.
- GIMENO, EJ. *Fundamentos da imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária*. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ilton José Nunes, 1995, p.17-51.
- GLASTONBURY, JWR; SEARSON, JE; LINKS, IJ. Clostridial myocarditis in lambs. *Australian Veterinary Journal*, v.65, n.7, p.208-209, 1988.
- GOLDMAN, M. *Fluorescent antibody methods*. New York: Academic 1968. 303p.
- GYLES, CL. Histotoxic clostridia. In: GYLES, CL, THOEN, CO (Eds). 2.ed. Ames: Iowa State University Press, p.106-113,1993.
- HAINES, D; CLARK, E. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Canadian Veterinary Journal*, v.32, n.4, p.295-302, 1991.
- HATHEWAY, CL. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n.1, p.66-98. 1990.
- HELMAN, G; WELSH, RD; STAIR, EL. et al. Diagnosing visceral blackleg as a cause of sudden death in cattle. *Veterinary Medicine*, v.92, n.10, p.914-918, 1997.
- HENDERSON, DW. Experiments with the "O" antigen of *Clostridium oedematiens maligni* (*Vibrion septique*). *British Journal of Experimental Pathology*, v.15, n.3, p.166-175, 1934.
- JUNGHERR, E; WELCH, H. A report on lamb diseases. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.72, p.317-326, 1927.
- KUHNERT, P; CAPAUL, SE; NICOLET, J.et al. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16srRNA gene sequences. *International Journal Systematic Bacteriology*, v.46, n.4, p.1174-1176, 1996.
- KUHNERT, P; KRAMPE, M; CAPAUL, SE.et al. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Veterinary Microbiology*, v.51, p.291-298, 1997.
- LEVETT, PN. Identification of clinically important anaerobes. In: ANAEROBIC microbiology: a practical approach. Oxford: IRL, 1991, p.29-49.
- LOBATO, FCF; ASSIS, RA. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, v.19, n.113, 2000.
- LUNA, LG. *Manual of the histologic staining: methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1968.
- PINTO, MP. Produção de conjugados para identificação de *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei* para a técnica de imunofluorescência direta. 50p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1992.
- PINTO, MP; ABREU, VLV. Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti-*Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, v.44, n.06, p.513-520, 1992.
- POWER, EP; WHITE, VJ; MACKESSY, EJ. et al. Bacillary haemoglobinuria of cattle: confirmation of the disease in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, v.41, n.4, p.255-257, 1987.

- SAMPAIO, IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SHAPTON, DA; BOARD, RD. *Isolation of anaerobes*. New York: Academic, 1971. 269p.
- SHIRASAKA, S; BENNO, Y. Isolation of *Clostridium septicum* from disease chickens in broiler farms. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v.44, n.5, p.807-809, 1982.
- SMITH, LDS. *The pathogenic anaerobic bacteria*. 3.ed, Illinois: Springfield, 1984. 550p.
- STERNE, M; BATTY, I. *Pathogenic clostridia*. London: Butterworths, 1975, 144p.
- STERNE, M; BATTY, I. Algunos aspectos del diagnóstico y control de las enfermedades por clostrídios. *Veterinaria*, v.15, n.70, p.73-77, 1977.
- STERNE, M. Clostridial infections. *British Veterinary Journal*, v. 137, n. 5, p. 443-454, 1981.
- TAYLOR, CR. Immunoperoxidase techniques. *Archives Pathology Laboratory Medicine*, v.102, n.3, p.113-121, 1978.
- UZAL., FA. Manual práctico de inmuistoquímica. San Carlos de Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1993, 28p (Comunicación Técnica, 230).
- VAN KAMPEN, KR; KENNEDY, PC. Experimental bacillary hemoglobinuria: intrahepatic detection of spores of *Clostridium haemolyticum* by immunofluorescence in rabbit. *American Journal of Veterinary Research*, v.29, n.11, p.2173-2177, 1968.
- VANNELLI, SA; UZAL, FA. *Clostridium septicum* detection by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.28, n.2, p.125-127, 1996.
- WOOD, BT; THOMPSON, SH; GOLDSTEIN, G. Fluorescent antibody staining. III. Preparation of fluorescein-isothiocyanate-labelled antibodies. *Journal of immunology*, v.95, p.225-229, 1965.