

Maristela Pimentel Pinto

17091
1992



PRODUÇÃO DE CONJUGADOS PARA
IDENTIFICAÇÃO DE *Clostridium septicum* E
Clostridium chauvoei PARA A TÉCNICA DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária
Área: Medicina Veterinária
Preventiva
Orientadora: Vera Lúcia Viegas
de Abreu

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000092309309

103/04

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte
Minas Gerais - Escola de Veterinária
1992

MV-00006414-4

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

05/03/93

923093-09

P659p Pinto, Maristela Pimentel, 1960-

Produção de conjugados para identificação de *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei* para a técnica de imunofluorescência direta/Maristela Pimentel Pinto.- Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1992.

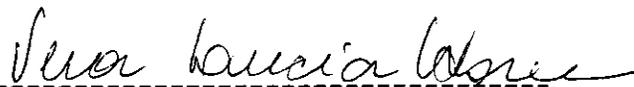
50 p. : il. -

Dissertação (Mestrado)

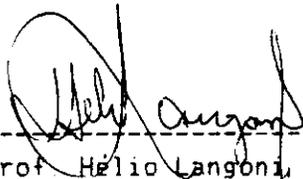
1-Imunofluorescência. Teses. 2-*Clostridium*. Teses. I. Título

CDD.636.089 69

Dissertação defendida e aprovada em 08/10/92, pela
Comissão Examinadora constituída por:



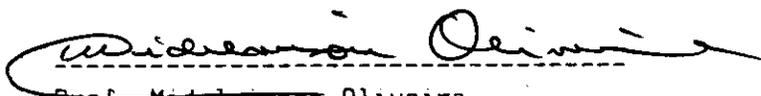
Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu
Orientadora



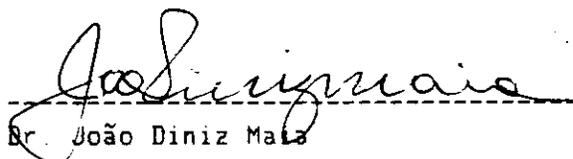
Prof. Hélio Langoni



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. Midelverson Oliveira



Dr. João Diniz Mala

*À minha mãe Maria e à minha irmã Marcia pelo amor,
companheirismo e cumplicidade, sempre presentes na minha vida.*

*A todas as mulheres que, por competência e/ou independência,
sofrem alguma forma de restrição em suas vidas profissional e
pessoal.*

Agradecimentos

À Prof^a. Vera Lúcia Viegas de Abreu pela competente orientação, constante estímulo, confiança e atenção, tornando, através do seu apoio e amizade, a realização desse trabalho um aprendizado gratificante e enriquecedor.

Aos Profs. Francisco C. F. Lobato e Midelverson de Oliveira pela participação e co-orientação.

Ao Prof. José Britto Figueiredo pelos ensinamentos e orientação inicial.

À Coordenação de Pós-Graduação, em especial à Prof^a. Vera Alvarenga Nunes, pelo auxílio e orientação nas várias etapas desse curso, e aos Profs. Romário Cerqueira Leite e Rômulo Cerqueira Leite pelo apoio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva dessa Escola, em especial ao veterinário Geraldo Márcio e à D^a. Nelly, pela colaboração e auxílio constantes.

Aos funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG pela competência e eficiência, difíceis de serem caracterizadas em palavras.

À Faculdade de Veterinária da Fundação Pinhalense de Ensino, Espírito Santo do Pinhal-SP, pela compreensão e estímulo.

Aos Profs. Célia N. M. Correa, Antônio Carlos Paes e aos funcionários da disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu-SP, pelo incentivo inicial e, em especial, ao Prof. Hélio Langoni pela presença constante na minha vida profissional.

À Eliane pela redação inicial do texto.

À Arlene, Débora, Edna, Ênio, Inês, Fana, Jailton e Sandra, Sérgio Balsamão, Sérgio Bambirra e Valéria que, pelo carinho,

amizade e compreensão nas horas difíceis, certamente não serão esquecidos.

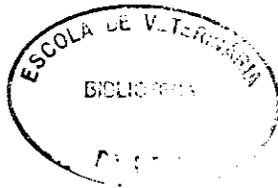
A todos os colegas da graduação e pós-graduação pelos vários momentos agradáveis durante o curso e, em especial, ao Marcelo e ao Orlando pela força na época da defesa.

Ao Leonardo, Marcia, Graça e Sérgio Luis pela amizade e apoio constante nos momentos mais difíceis, e ainda, aos dois primeiros, pela composição e impressão do texto final.

À minha família pelo carinho e apoio.



Essa tese contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (403114/90-0 VT/FV/PQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (CAG 410/90) e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEP-MVZ.



"Educação. Do latim *educere*, que significa extrair, tirar, desenvolver. Consiste, essencialmente, na formação do homem de caráter. A educação é um processo vital, para o qual concorrem forças naturais e espirituais, conjugadas pela ação consciente do educador e pela vontade livre do educando. Não pode, pois, ser confundida com o simples desenvolvimento ou crescimento dos seres vivos, nem com a mera adaptação do indivíduo ao meio. É atividade criadora, que visa levar o ser humano a realizar as suas potencialidades físicas, morais, espirituais e intelectuais. Não se reduz à preparação para fins exclusivamente utilitários, como uma profissão, nem para o desenvolvimento de características parciais da personalidade, como um dom artístico, mas abrange o homem integral, em todos os aspectos de seu corpo e de sua alma, ou seja, em toda a extensão de sua vida sensível, espiritual, intelectual, moral, individual, doméstica e social, para elevá-la, regulá-la e aperfeiçoá-la. É processo contínuo, que começa nas origens do ser humano e se estende até à morte."

Enciclopédia Brasileira de Moral e Civismo - Ministério de Educação e Cultura

SUMÁRIO

RESUMO	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 LITERATURA CONSULTADA.....	21
2.1 ALGUNS ASPECTOS CULTURAIS E SOROLÓGICOS DE <i>Clostridium septicum</i> E <i>Clostridium chauvoei</i>	21
2.2 FRACIONAMENTO DE IMUNOGLOBULINAS.....	26
2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 LOCAL DO TRABALHO	31
3.2 PRODUÇÃO DO SORO HIPERIMUNE	31
3.2.1 PREPARO DO ANTÍGENO	31
3.2.2 INOCULAÇÃO DO ANTÍGENO.....	32
3.2.3 VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	32
3.2.4 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DO SORO	33
3.3 PREPARO DOS CONJUGADOS PARA IMUNOFLUORES- CÊNCIA	33
3.3.1 FRACIONAMENTO DAS IMUNOGLOBULINAS.....	33
3.3.1.1 FRACIONAMENTO DE IMUNOGLOBULINAS COM SULFATO DE AMÔNIO	33
3.3.1.2 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G (IgG) COM ÁCIDO CAPRÍLICO E SULFATO DE AMÔNIO.....	34
3.4 CONJUGAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE FLUORES- CEÍNA.....	35
3.5 AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DOS CONJUGADOS.....	35
3.5.1 COLORAÇÃO DAS LÂMINAS.....	36
3.5.2 INIBIÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
3.5.3 ADSORÇÃO.....	37
3.5.4 MICROSCOPIA	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÕES	44
SUMMARY.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46



RESUMO

Foram produzidos conjugados anti-*C. septicum* e anti-*C. chauvoei* para a técnica de imunofluorescência direta. O meio de cultura utilizado, enriquecido com 0,5% de glicose e 0,1% de cisteína, propiciou crescimento rápido e expressivo de *C. septicum* e *C. chauvoei*. Os antígenos contendo $3,2 \times 10^8$ a $3,4 \times 10^8$ células/ml foram considerados satisfatórios para produção de soro imune e testes de aglutinação. Os conjugados preparados a partir de soros imunes fracionados com ácido caprílico/sulfato de amônio obtiveram títulos oito vezes maiores que os precipitados com sulfato de amônio. Para verificação da especificidade dos conjugados foram testados antígenos heterólogos, assim como amostras isoladas a partir de materiais de campo enviados à Escola de Veterinária da UFMG e foram realizados testes de inibição da fluorescência e adsorção com antígenos heterólogos e homólogos.

PALAVRAS-CHAVE: Imunofluorescência direta, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, conjugados.

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Clostridium*, caracterizadas por seu poder de invasão e multiplicação nos tecidos, são responsáveis por importantes patologias. No homem tais enfermidades assumem importância em épocas de guerra, quando são freqüentes as contaminações de ferimentos extensos com traumatismos dos tecidos, penetração de corpos estranhos e fraturas expostas. Em animais as infecções são relevantes em virtude do grande número de espécies afetadas, da característica epizootica que assumem em algumas circunstâncias e da alta taxa de letalidade, ocasionando, conseqüentemente, sérios prejuízos econômicos quando atingem animais de exploração zootécnica.

Em várias partes do mundo o *C. septicum* e o *C. chauvoei* são incriminados como os principais patógenos causadores de miosites em bovinos (BARNES et al, 1975, ARDEHALI et al, 1988). Estudos feitos entre 1958 e 1975 mostram a ocorrência de infecção mista de *C. chauvoei* e *C. septicum* em 56% de 173 casos de mionecroses (WILLIAMS, 1977). No Brasil, *C. chauvoei* e *C. septicum* são os agentes mais freqüentes das mionecroses. No período de 1970-1979, em 2082 materiais suspeitos enviados ao Instituto Biológico de São Paulo, foram encontrados 10,45% de amostras positivas para esses microorganismos (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).

Apesar do número de focos e de animais afetados por clostridioses ser elevado, a maior parte dos diagnósticos é baseada apenas em dados clínicos e/ou lesões de necropsia. O isolamento bacteriológico das espécies de *Clostridium* normalmente requer procedimentos demorados e dispendiosos. A diferenciação entre *C. chauvoei* e *C. septicum* é dificultada devido à similaridade dos caracteres morfológicos e de reações bioquímicas. Os diagnósticos baseados em inoculação de animais de laboratório são, por vezes, errôneos (STERNE, 1977).

A técnica de imunofluorescência como meio de diferenciação e identificação de *C. septicum* e *C. chauvoei* em esfregaços de tecidos foi demonstrada por BATTY & WALKER (1963a). O teste é utilizado mundialmente, apresentando-se como método seguro, rápido e de fácil manipulação. Nos Estados Unidos, no período de 1977-1978, a principal técnica usada para diagnóstico foi a imunofluorescência (NERVIG et al, 1981).

Apesar do uso generalizado da técnica de imunofluorescência direta, os conjugados utilizados para sua execução restringem-se, quase que exclusivamente, aos produzidos pelo Wellcome Research Laboratories - Beckenham Kent - England (recomendados para pesquisa). O preparo destes conjugados, assim como o domínio da técnica de seu preparo e uso, contribuirão para reduzir a dependência de produtos importados, reduzindo também o tempo do diagnóstico.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o preparo de conjugados para identificação de *C. septicum* e *C. chauvoei* para a técnica de imunofluorescência direta.



2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 ALGUNS ASPECTOS CULTURAIS E SOROLÓGICOS DE *Clostridium septicum* E *Clostridium chauvoei*

ROBERTSON (1919-1920), através de reações de aglutinação, demonstrou a existência de, no mínimo, três tipos sorológicos de *C. septicum*. A produção de antígeno para inoculação em coelho e produção de soro imune foi realizada após cultivo do microorganismo em caldo glicosado por 24-48 horas. A suspensão final foi diluída em salina até a obtenção de 700 a 800 milhões de células por ml e aquecida a 56°C por 30 minutos. O antígeno para os testes de aglutinação foi preparado de forma semelhante e a leitura realizada em tubos, após incubação a 56°C por duas a três horas. O autor ressaltou, ao descrever um método para produção de toxinas de *C. septicum*, que nos meios com glicose, 22 a 27 horas após a inoculação, as bactérias começavam a aglutinar e formar depósito no fundo do tubo.

FELIX & ROBERTSON (1928), estudando anaeróbios esporulados, analisaram qualitativamente, por aglutinação, antígenos de *C. septicum* e *C. tetani*, estabelecendo a presença do antígeno somático, termoestável ("O") e do antígeno flagelar, termolábil ("H"). As dificuldades encontradas para o preparo de suspensões de antígeno estáveis para os testes foram superadas usando-se concentrações salinas reduzidas.

ROBERTSON & FELIX (1930) observaram que, em relação ao *C. septicum*, o antígeno somático era o fator mais importante para indução de imunidade, demonstrando o valor do mesmo na produção de soro com potência profilática.

HENDERSON (1932) investigou amostras de *C. chauvoei* de várias partes do mundo encontrando um antígeno "O" comum a todas as amostras oriundas de bovinos e ovinos. O antígeno "H" também era comum, com exceção das amostras inglesas de origem ovina. Para a produção de soro imune e testes de aglutinação foram utilizadas culturas com 14-16 horas de crescimento em caldo com 1% de glicose. As suspensões para

inóculo foram ajustadas a 10 vezes a opacidade do tubo 10 da escala de Brown. Vários métodos foram testados para as provas de aglutinação visando o preparo de suspensões estáveis que não demonstrassem auto-aglutinação.

HENDERSON (1934) confirmou a imunidade estabelecida contra *C. septicum* com a utilização do antígeno somático, constatando imunidade tipo-específica. O antígeno "O" usado para imunização de cobaias foi produzido a partir de culturas com 14-16 horas de crescimento em caldo glicosado a 1%, com opacidade equivalente a 10 vezes o tubo 10 da escala de Brown.

THOROLD (1953), avaliando a capacidade imunogênica de vacinas de *C. chauvoei* obtidas de culturas em sacos celofane, em bovinos e ovinos, empregou o teste de aglutinação em lâmina, misturando uma gota de antígeno com uma gota de soro-teste. A aglutinação ocorria após 1-2 minutos e a leitura era feita com lentes de pequeno aumento. O antígeno utilizado foi diluído em solução salina correspondendo à opacidade do tubo sete da escala de Brown. O autor concluiu ser a técnica de valor limitado para a avaliação da eficiência de vacinas.

MOUSSA (1959) descreveu uma fórmula antigênica para antígenos somáticos, flagelares e de esporos ("S") para *C. septicum* e *C. chauvoei*, facilitando o estudo das relações antigênicas entre as duas espécies. 37 amostras de *C. septicum* e 38 de *C. chauvoei* foram examinadas pelos métodos de aglutinação e adsorção com soros imunes representando os diferentes tipos dos dois microorganismos. O preparo do antígeno na forma vegetativa, para inoculação em coelhos, foi realizado após crescimento das bactérias a 37°C em caldo glicosado a 1%, por 10-14 horas. Após o período de incubação, as culturas foram aquecidas a 80°C por 10 minutos, centrifugadas e lavadas quatro vezes em solução salina, ajustadas com água destilada à concentração de 10 vezes a opacidade correspondente ao tubo 10 da escala de Brown e acrescidas de formoldeído à concentração final de 0,2%. Foram preparados também antígenos "O" e "H" para os testes de aglutinação e o antígeno "S", para os testes e produção de soro imune. Os resultados obtidos levaram o autor a concluir que as amostras de *C. septicum* poderiam ser divididas em seis grupos definidos por dois antígenos somáticos e cinco antígenos flagelares e as de *C. chauvoei* em dois grupos baseados em dois antígenos flagelares diferentes, exclusivos dessa espécie, sendo que todas as amostras dos clostrídeos estudados possuíam o antígeno "S" em comum.

Continuando os estudos, MOUSSA (1959) concluiu que a ocorrência de aglutinação cruzada entre as duas bactérias dependia do grau de esporulação das culturas e dos métodos usados para o preparo do antígeno. A estabilidade das suspensões foi obtida com baixas concentrações salinas, lavagens repetidas e preparo de suspensões puras das formas vegetativas e esporuladas. O autor propôs uma fórmula antigênica para cada grupo, onde o antígeno "S" é representado por letra maiúscula romana, os antígenos "O" por numerais arábicos e os antígenos "H" por letras romanas minúsculas, transcrita abaixo:

C. septicum

Grupo I - A; 1; a, b(traços)
 Grupo II - A; 2; a(traços), b
 Grupo III - A; 1; c
 Grupo IV - A; 2; c
 Grupo V - A; 2; d
 Grupo VI - A; 2; e

C. chauvoei

Grupo VII - A; 3; f
 Grupo VIII - A; 3; g

Para o preparo do antígeno "O", BATTY & WALKER (1963a) utilizaram amostras de *C. septicum* e *C. chauvoei* após crescimento em caldo com 1% de glicose por 12 a 16 horas. As células foram lavadas seis vezes com solução salina, diluídas à turbidez equivalente ao tubo número oito da escala de Brown e inativadas por aquecimento a 100°C por 60 minutos. Para a produção de soro imune os autores utilizaram a mistura de duas amostras de *C. septicum* representando os dois grupos de MOUSSA (1959) e três amostras de *C. chauvoei*. Foram produzidos, também, soro imune para cada amostra separadamente. Os títulos observados nos soros imunes, no teste de aglutinação, foram da ordem de 1:320.

SMITH & HOLDEMAN (1968) mencionaram que a cisteína exerce efeito favorável no crescimento de *C. septicum* e *C. chauvoei* quando adicionada aos meios de cultura. Os autores alertaram que, no teste de aglutinação, as reações cruzadas entre esses microorganismos aparentemente são devidas ao antígeno "S" e que só ocorrem quando culturas velhas e esporuladas são utilizadas como antígenos para teste de aglutinação ou para produção de soro imune. Observaram ainda que os testes de aglutinação para *C. chauvoei* eram limitados devido à tendência

de várias amostras à auto-aglutinação, recomendando para o preparo das suspensões a utilização de culturas novas, com crescimento rápido. Para prevenir auto-aglutinação durante o cultivo sugeriram que: 1 - As bactérias precisariam crescer em meios tamponados; 2 - A suspensão bacteriana e as diluições de soro deveriam ter a concentração de sal de 0,4 a 0,5%; 3 - O pH das suspensões teria que ser ajustado para 6,8 a 7,2.

CLAUS & MACHEAK (1972) descreveram um método de produção de antígeno de *C. chauvoei* contendo 4×10^8 células por ml e verificaram que, no processo de elaboração do antígeno, o crescimento celular deve ocorrer rapidamente, o inóculo deve ser obtido em, no máximo, oito horas e a adição de formalina deve ser feita com o mínimo de agitação possível para que não ocorra auto-aglutinação. Os autores desenvolveram ainda um teste de aglutinação em placa para determinação de anticorpos circulantes e atestaram o potencial da técnica na avaliação da resposta imune, comparando os resultados obtidos no teste de aglutinação com os resultados dos testes de desafio em cobaio. O teste foi realizado em mais de 2000 soros de cobaias. O soro e o antígeno foram misturados em placas de vidro e a leitura realizada após oito a dez minutos.

STERNE & BATTY (1975) afirmaram que a adição de glicose aos meios de cultivo na proporção de 0,5 a 1% aumentava o crescimento bacteriano, a produção de toxinas e que os anticorpos mais específicos para identificação dos clostrídeos eram aqueles contra os antígenos termoestáveis das células vegetativas, aconselhando que o preparo de antígeno para produção de soro imune deveria ser realizado inativando-se culturas novas com crescimento ativo através do aquecimento a 100°C, antes que a esporulação tenha se iniciado. Nas espécies com tipos aglutinogênicos distintos, como o *C. septicum*, representantes de cada tipo deveriam ser incluídos.

LOPES (1977), avaliando seis imunógenos comerciais em uso no Brasil, constatou não existir qualquer nível de proteção anti-*C. septicum* nas bacterinas contendo esse microorganismo. As amostras de *C. septicum* utilizadas foram: 1 - *C. septicum*-4 (Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, England); 2 - *C. septicum* (Laboratório FAMA Ltda, Belo Horizonte, Brasil); 3 - *C. septicum* (OMS), não havendo especificações quanto aos grupos antigênicos de MOUSSA (1959).

DANESCU et al (1978) prepararam antígeno de *C. septicum* com duas amostras: VS8 e VS59 para testes de aglutinação e produção de soro imune. Após crescimento em meio glicosado a 0,5%, por 18-24 horas, as culturas foram centrifugadas e a massa bacteriana ressuspensa em salina fisiológica pH 7,0. A inativação das suspensões foi realizada com a adição de formol a 0,6%. Para verificação da produção de anticorpos foi utilizada a prova de aglutinação lenta com títulos de 1:40 a 1:80.

SHIRASAKA & BENNO (1982) observaram as características sorológicas das amostras de *C. septicum* isoladas em surtos de edema maligno ocorridos no Japão. A caracterização sorológica foi realizada pelo método de aglutinação em tubos, com leituras realizadas após três horas de incubação a 37°C e após 18 horas a 2°C. Foram preparados antígenos a partir de culturas com 18 horas de incubação e a inativação das mesmas para produção do soro imune foi feita com adição de 0,2% de formalina. Para o teste de aglutinação as culturas foram aquecidas a 100°C durante 60 minutos.

SHIRASAKA et al (1983) estudaram 75 amostras de *C. septicum* pelas provas de aglutinação em placa e em tubo, com antígeno "O", utilizando 68 amostras isoladas de casos clínicos e sete amostras de referência obtidas do "National Collection of Types Cultures" (NCTC). Os resultados obtidos agruparam as amostras em três grupos sorológicos distintos, baseados no antígeno somático.

JAIN et al (1987) recomendaram o uso da técnica de aglutinação para o teste de vacinas anti-*C. chauvoei* em caprinos e bovinos. No preparo do antígeno o número de bactérias foi aferido à turbidez equivalente ao tubo sete da escala de Brown. O método de aglutinação em lâmina foi realizado misturando-se uma gota do antígeno com uma gota de soro, com leitura realizada após um a dois minutos. Grumos esbranquiçados foram observados macroscopicamente em soros imunes preparados em coelhos, assim como em soros de caprinos e bovinos vacinados. Não foram constatados resultados positivos em soros de coelhos não imunizados. O teste de aglutinação em tubos foi feito utilizando-se quantidades iguais de antígeno e diluições do soro imune. Os títulos encontrados foram de 1:640 para os soros dos coelhos e 1:80 para os soros dos animais vacinados, concluindo os autores que em animais vacinados o título de 1:80 era satisfatório.



2.2 FRACIONAMENTO DE IMUNOGLOBULINAS

O soro total já foi utilizado no preparo de conjugados para imunofluorescência. Entretanto, a partir da década de 60, com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais mais apuradas, os pesquisadores passaram a trabalhar com gamaglobulinas purificadas, o que exige menor quantidade de fluorocromo e resulta em maior especificidade das colorações. Atualmente a purificação de imunoglobulinas pode ser realizada por vários métodos que incluem: precipitação por sais, filtração em gel, cromatografia de troca iônica, eletroforese, ultracentrifugação, proteína-A e proteína-A-sepharose. A precipitação por sais ocorre devido à solubilidade diferenciada das proteínas na presença de diferentes concentrações de íons, induzindo precipitação pela desidratação das proteínas na solução. A precipitação é feita com sulfato de sódio para soro de aves e sulfato de amônio para soro de mamíferos, sendo esta última uma das técnicas mais comumente utilizadas (GOLDMAN, 1968; WARR, 1984).

KAUFMAN & CHERRY (1961) avaliaram o efeito do sulfato de amônio na conjugação de imunoglobulinas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e na coloração produzida, além de analisarem alguns fatores para a remoção do mesmo por diálise. Os autores concluíram que a presença de sulfato de amônio interfere na subsequente conjugação e que, em diálise frente a dois litros de solução salina, utilizando-se tubos de diálise com 20/32 ou 27/32 polegadas de diâmetro, no período de quatro horas, há a remoção completa do sal em 20ml da suspensão de imunoglobulinas.

HEBERT & PITTMAN (1965), estudando os fatores que afetam a remoção do sulfato de amônio residual em suspensões de imunoglobulinas, observaram que em amostras dialisadas em tubos com 27/32 polegadas de diâmetro e 0,001 polegadas de espessura, frente a 200 volumes de solução salina (com troca às quatro e oito horas), houve a remoção de 87,1%, 95,7%, 99,4%, 99,7% e 100% do sal em período de duas, quatro, seis, oito e 24 horas, respectivamente.

McKINNEY & PARKINSON (1987) descreveram técnica para purificação de imunoglobulinas (Ig) do soro sanguíneo utilizando ácido caprílico e sulfato de amônio. O processo foi desenvolvido para a purificação da fração IgG do soro de coelhos, podendo ser usado também para soro de outros mamíferos (equinos, caprinos, ovinos, ratos e camundongos), assim como para anticorpos

monoclonais de líquido ascítico de camundongo. Os efeitos das amostras de soro, diluição, pH, concentração de ácido caprílico, temperatura e tempo de incubação com ácido caprílico foram estudados. A purificação de IgG foi monitorada por eletroforese em gel de agarose e a pureza final determinada por SDS-PAGE, demonstrando resultados iguais aos obtidos com IgG purificadas por combinação de sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. Para determinação do rendimento de IgG purificadas foram utilizados soros de coelhos imunizados com NADPH-citocromo P-450 redutase. A quantificação da concentração de IgG foi estabelecida por ELISA e por imunoinibição, comparando-se o título do anti-soro imune com o título da IgG purificada requerida para inibir a atividade catalítica de NADPH-citocromo P-450 redutase em 50%. Nos dois métodos, os pesquisadores verificaram que 80-90% da fração IgG foi recuperada e concluíram que, devido à rapidez, simplicidade, baixo custo e não necessitar de equipamentos especiais, a técnica de purificação com ácido caprílico ofereceu vantagens quando comparadas a outros métodos.

2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

RIGGS et al (1958) definiram o uso do isotiocianato de fluoresceína (FITC) como marcador estável de anticorpos. O soro imune, produzido em coelhos, foi precipitado com sulfato de amônio e submetido à diálise. A concentração de proteínas foi determinada e o processo de conjugação realizado acrescentando-se 50µg de FITC por mg de proteína. A retirada da fluoresceína livre foi feita por diálise em PBS 0,01M pH 7,2. As lâminas com esfregaços de bactérias foram fixadas em acetona fria por 15 minutos, cobertas com soro imune marcado e incubadas a 37°C por 20 minutos. Após quatro lavagens em solução salina tamponada, essas lâminas coradas foram montadas em glicerol tamponado pH 8,0. A especificidade das reações foi testada com o uso de soros normais ou por inibição de fluorescência.

BATTY & WALKER (1963a) utilizaram a técnica de imunofluorescência direta para a diferenciação de *C. septicum* e *C. chauvoei*. A conjugação foi realizada com FITC, 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 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. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, fixadas em acetona por 10 minutos, coradas em câmara úmida por 30 minutos, lavadas em tampão fosfato por 10 minutos e montadas em glicerol tamponado fosfatado pH 7,2. A imunofluorescência direta e os testes de aglutinação realizados deram resultados concordantes. Os conjugados, feitos a partir de amostras individuais de *C. septicum* dos dois grupos de MOUSSA (1959), não mostraram reações cruzadas entre si, tanto na imunofluorescência quanto na aglutinação, confirmando a existência dos dois grupos de *C. septicum*.

BATTY & WALKER (1963b) reafirmaram os resultados obtidos anteriormente e concluíram que os conjugados só devem ser usados de forma rotineira para diagnóstico após confirmado que eles coram todas as amostras homólogas mas não as heterólogas.

PITAL & JANOWITZ (1963) avaliaram o efeito da alcalinidade na intensidade fluorescente de conjugados. Segundo os autores, apesar da técnica de lavagem de esfregaços e montagem em lâminas ser utilizada com maior frequência em salina tamponada pH 7,2, esfregaços de bactérias lavados com tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,0 e montados em glicerol tamponado pH 9,0 apresentaram maior intensidade de fluorescência, além de exibirem coloração em diluições maiores dos conjugados.

HIRAMOTO & HAMLIN (1965), trabalhando com conjugados preparados com tetrametil-rodamina e FITC nas mesmas células, verificaram que em pH 4,0 a fluorescência verde do FITC era inibida permitindo a visualização da fluorescência laranja da rodamina, e em pH 10,0 a fluorescência do FITC podia ser reativada.

WOOD et al (1965), observando as mudanças nas propriedades das proteínas quando são conjugadas com FITC na concentração de 25µg por mg de proteína, enfatizaram que quando as moléculas de fluoresceína se fixam, a solubilidade, a atividade específica e o ponto isoelétrico das imunoglobulinas decrescem. Com quantidade insuficiente de fluorocromo conjugado não há emissão de luz satisfatória para a molécula ser bem visualizada. Quando a coloração final é brilhante, no entanto, observam-se colorações inespecíficas, devendo ser retirado o excesso de fluorocromo utilizando-se cromatografia de troca iônica.

PITTMAN et al (1967), estudando uma técnica para mensuração precisa de colorações inespecíficas produzidas por conjugados marcados com FITC, verificaram que a pureza do corante usado na conjugação influencia as colorações. O efeito da temperatura de estocagem para lâminas fixadas também foi observado. Esfregaços fixados com metanol, estocados à temperatura ambiente, apresentaram-se inviáveis para testes em 48 horas, à temperatura de -10°C foram considerados viáveis por dois meses e a -70°C por 12 meses.

GOLDMAN (1968) propôs para o preparo de conjugados a proporção de 25 a $50\mu\text{g}$ de fluorocromo bruto, ou a metade dessa proporção quando utiliza-se fluorocromo purificado, para cada mg de proteína a ser marcada e recomendou a remoção do FITC livre ou por diálise frente à água e posteriormente frente à salina tamponada fosfatada (PBS) durante aproximadamente uma semana, ou por filtração em gel com Sephadex G-25 ou G-50, equilibrado em PBS pH 7,0 a 7,5. A utilização de controles para verificação da especificidade da fluorescência deveria ser realizada expondo o antígeno à anticorpos homólogos não conjugados antes ou ao mesmo tempo da exposição ao conjugado, bloqueando ou inibindo uma coloração. O autor alertou também que espécies taxonomicamente próximas podem ter antígenos em comum e causar reações cruzadas de intensidade variável, interpretadas erroneamente como colorações não específicas. A adsorção do soro imune com igual volume de massa bacteriana dos antígenos heterólogos causadores de reações cruzadas poderia ser utilizada. Em virtude dos conjugados serem quase sempre mais diluídos que o soro original, a adsorção deveria ser realizada com um número consideravelmente menor de microorganismos do que o requerido para o soro total. Para evitar colorações inespecíficas foi indicado o fracionamento em coluna de DEAE-celulose. Imunoglobulinas carreando baixa quantidade de FITC retém as características de cargas de globulinas não conjugadas, sendo eluídas da coluna com baixas concentrações de sal em pH 6,3, mostrando, posteriormente, a coloração mais específica. As imunoglobulinas, associadas às colorações inespecíficas, marcadas com grande quantidade de FITC ficariam retidas na coluna.

STERNE & BATTY (1975) recomendaram a conjugação de imunoglobulinas com FITC na proporção de $50\mu\text{g}$ por mg de proteína por período de 18 horas, e a remoção do excesso de FITC utilizando-se coluna de Sephadex G-25 e diálise em PBS.

DANESCU et al (1978) utilizaram a técnica de imunofluorescência direta para identificação de espécies do gênero *Clostridium*. As concentrações proteicas encontradas, após precipitação com sulfato de amônio e diálise dos soros, foram de 1,08 a 1,74g/100ml. Para a conjugação, realizada por 18 a 20 horas a 4°C, o FITC foi utilizado 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 *C. chauvoei* corados com conjugado de *C. septicum*.

DE LUCA (1984) relatou que a conjugação de imunoglobulinas com isotiocianato de fluoresceína realizada no escuro, à temperatura ambiente, se processa em uma ou duas horas, e a 4°C em 18 a 24 horas. O autor aconselhou o uso do FITC na concentração de 20µg por mg de proteína e a retirada do fluorocromo livre por diálise ou por filtração em gel com Sephadex G-25 em coluna de 1,5cm de diâmetro e 2cm de altura para cada ml de proteína conjugada.

HUDSON & HAY (1989) recomendaram para conjugação de proteínas a proporção de 50µg de isotiocianato de fluoresceína por mg de proteína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO TRABALHO

O preparo dos conjugados foi realizado no Laboratório de Doenças Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

3.2 PRODUÇÃO DO SORO HIPERIMUNE

3.2.1 PREPARO DO ANTÍGENO

Para o preparo do inóculo foram utilizadas as amostras: *Clostridium septicum* VS3¹ e *Clostridium chauvoei*².

A patogenicidade das amostras foi verificada através da inoculação em cobaios de 1ml das culturas por via intramuscular, sendo utilizado quatro animais pesando entre 250 e 350g. A observação de sintomas foi realizada até 48 horas após a inoculação. Os animais foram sacrificados e, à necropsia, foram constatadas as lesões características correspondentes descritas por STERNE & BATTY (1975). Impressões de fígado e músculo foram coradas pela técnica de Gram para confirmação da morfologia típica de *C. septicum* e *C. chauvoei*. Posteriormente, macerados de fígado e músculo foram semeados em meio de Tarozzi (BIER, 1982), e incubados a 37°C por 48 horas. Após crescimento adequado, verificado produção de gás, cada amostra foi repicada em caldo cérebro-coração pH 7,4, acrescido com 0,3% de glicose para concentração final de 0,5% e 0,1% de cisteína e incubada a 37°C por 18 horas em anaerobiose. Decorrido esse tempo, as culturas foram colocadas em banho-maria a 100°C por uma hora e centrifugadas a 1000g, sob refrigeração, durante 30 minutos. Após constatação das formas vegetativas e pureza das amostras, as células foram lavadas quatro vezes em solução salina estéril a 0,85%, ressuspensas e

¹ Instituto Biológico de São Paulo (IBSP), SP

² Central Veterinary Laboratory - Bacteriology Department - Ministry of Agriculture, Fisheries and Food
Central Laboratory, Weybridge, Surrey, England

agitadas vigorosamente até que as suspensões se tornassem homogêneas. A seguir, foram diluídas à turbidez equivalente ao tubo sete da Escala de McFarland, acrescidas de formoldeído a 0,5% e mantidas a 37°C por 24 horas. A determinação do número de bactérias por ml baseou-se no método de PRESCOTT & BREED (1910) com as seguintes modificações: A suspensão bacteriana foi diluída a 10^{-3} em solução salina estéril a 0,85% e a contagem das bactérias foi realizada em microscopia de campo escuro.

Após controle de esterilidade em meio de Tarozzi e caldo cérebro-coração suplementado com glicose e cisteína a 37°C por 48 horas, as suspensões bacterianas foram emulsionadas em volumes iguais com adjuvante completo de Freund. Suspensões bacterianas não emulsionadas foram estocadas.

3.2.2 INOCULAÇÃO DO ANTÍGENO

Decorridas 24 horas do preparo das emulsões, as mesmas foram inoculadas em coelhos da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 2,5kg, sendo utilizados três animais por amostra.

A dose de antígeno por animal foi de 0,4ml, sendo a aplicação realizada inicialmente com 0,1ml em cada coxim plantar e, posteriormente, em quatro sítios diferentes, pelo dorso dos animais, por via intradérmica. Foram feitas cinco inoculações intervaladas de sete dias, sendo a última realizada sem o adjuvante completo de Freund.

3.2.3 VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Para constatação da produção de anticorpos foram feitas sangrias por punção na veia marginal da orelha.

A presença de anticorpos anti-*C. septicum* e anti-*C. chauvoei* foi verificada através do método de aglutinação em placa. Os antígenos utilizados foram os mesmos dos inóculos. Para o teste foram misturados uma gota do antígeno com uma gota do soro em placa de vidro. As leituras foram realizadas após movimentos suaves de rotação por período de dois minutos, conforme descrito por JAIN et al (1987). Para controle, o antígeno foi testado frente aos soros de dois animais não imunizados.

3.2.4 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DO SORO

A sangria total dos animais inoculados foi realizada após sete dias da última inoculação por punção cardíaca. Após coagulação à temperatura ambiente por uma hora e retração do coágulo por 12-18 horas a 4°C, os soros foram decantados, centrifugados a 650g por cinco minutos para sedimentação dos eritrócitos, a 1000g por 15 minutos para clarificação e estocados a -18°C e -70°C até o uso.

3.3 PREPARO DOS CONJUGADOS PARA IMUNO-FLUORESCÊNCIA

3.3.1 FRACIONAMENTO DAS IMUNOGLOBULINAS

Os soros foram inativados em banho maria a 56°C durante 30 minutos e centrifugados, sob refrigeração, a 1000g por 15 minutos.

A purificação de imunoglobulinas a partir dos soros imunes foi realizada mediante fracionamento de imunoglobulinas apenas com sulfato de amônio³ (GOLDMAN, 1968) e segundo a técnica descrita por McKINNEY & PARKINSON (1987), realizada em duas etapas utilizando-se ácido caprílico⁴ e sulfato de amônio.

3.3.1.1 FRACIONAMENTO DE IMUNOGLOBULINAS COM SULFATO DE AMÔNIO

Ao soro foi adicionado, lentamente e sob agitação a 4°C, igual volume de solução saturada de sulfato de amônio pH 7,0. Após agitação por uma hora a 4°C, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos, 1000g, sob refrigeração e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em água destilada estéril (volume inicial do soro), reprecipitado com solução saturada de sulfato de amônio (v/v) e centrifugado como já descrito. Após descarte do sobrenadante, o sedimento obtido foi suspenso em salina tamponada fosfatada (PBS) 0,15M pH 7,2, no volume inicial do soro.

³ REAGEN - Quimbras Industrias Químicas S.A.

⁴ Ibid.

A seguir, às imunoglobulinas foram submetidas à diálise frente a um volume 400 vezes maior de PBS 0,15M pH 7,2, durante 2-4 dias, com troca do PBS a cada 12-18 horas, para eliminação do sulfato de amônio. Para verificação do sulfato de amônio residual adicionou-se uma gota do PBS da diálise em 0,5ml de solução de cloreto de bário acidificada (HUDSON & HAY, 1989).

3.3.1.2 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G (IgG) COM ÁCIDO CAPRÍLICO E SULFATO DE AMÔNIO

Um volume de soro foi diluído em quatro volumes de tampão acetato (60mM pH 4,0) e o pH ajustado para 4,5 com NaOH 0,1N. A purificação das imunoglobulinas G foi feita pela precipitação da albumina e outras proteínas adicionando-se 25 µl de ácido caprílico por ml do soro diluído. A adição do ácido caprílico foi feita, gota a gota, sob vigorosa agitação e mantida por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi em seguida centrifugada a 10.000g por 30 minutos para remoção do material insolúvel e o sobrenadante filtrado em pré-filtros millipore (AP 20 22 00). Para cada 10 volumes de sobrenadante foi acrescentado um volume de PBS com EDTA, 10 vezes concentrado (pH 7,4) e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N. Após adição de 0,277g/ml de sulfato de amônio e agitação constante durante 30 minutos a 4°C, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 5000g e o sedimento ressuspenso em PBS com EDTA (pH 7,4) na metade do volume original. A seguir, a solução foi dialisada frente a um volume 400 vezes maior de PBS com EDTA (pH 7,4) por 2-4 dias, com troca do PBS a cada 12-18 horas.

As membranas utilizadas na diálise para as duas técnicas, com 7/8 polegadas de diâmetro e 0,001 polegadas de espessura, foram fervidas em bicarbonato de sódio a 2% e EDTA 0,001M durante 10 minutos. Após serem lavadas em água destilada foram fervidas em EDTA 0,001M durante 10 minutos e armazenadas submersas em EDTA a 4°C. Imediatamente antes do uso foram lavadas várias vezes com água destilada.

As concentrações de proteínas das suspensões dialisadas foram determinadas por leitura em refratômetro⁵ e pelo método de

⁵ ATAGO JAPAN

Lowry, modificado por HARTREE (1972), utilizando-se espectrofotômetro⁶.

3.4 CONJUGAÇÃO COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA⁷

A conjugação dos soros foi realizada à temperatura de 4°C. Cada soro, após determinada a concentração proteica, foi colocado em erlenmeyer, sob agitação, por 15 minutos. Ao mesmo foi adicionado, gota a gota, 10% de tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,5. Após 30 minutos sob agitação, foi adicionado 25µg de isotiocianato de fluoresceína para cada mg de proteína (WOOD et al, 1965), ficando o soro sob agitação por 18 horas.

A remoção do isotiocianato livre foi realizada a 4°C, por passagem do conjugado em coluna de Sephadex G-50⁸ com 1cm de diâmetro, equilibrada e eluída com PBS pH 7,2. Para cada ml de soro foram depositados na coluna 3,0 a 3,5cm de gel suspenso em PBS pH 7,2.

As frações colhidas foram agrupadas de acordo com a concentração de proteína determinada por refratômetro, e dialisadas a 4°C frente a um volume 200 vezes maior de PBS pH 7,2 durante 5-6 dias, com troca do PBS a cada 12-18 horas até o mesmo não apresentar fluorescência.

Após titulação, os conjugados foram distribuídos em alíquotas e congelados a -18°C e -70°C (De LUCA, 1984).

3.5 AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DOS CONJUGADOS

Os conjugados foram analisados usando-se como antígeno amostras de campo isoladas a partir de material enviado à Escola de Veterinária da UFMG e as seguintes amostras de referência:

- *C. septicum*: 1 - Amostra cedida pelo Laboratório Noli, RS; 2 - Amostra do Central Veterinary Laboratory - Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Central Laboratory, Weybridge, Surrey, England;

6 BAUSCH & LOMB, Spectronic 20

7 INLAB

8 Pharmacia Fine Chemicals



- *C. chauvoei*: 1 - Amostra cedida pelo Laboratório Noli, RS; 2 - Amostra A-43, cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo (IBSP); 3 - Amostra do Laboratório Valleé, cedida pelo IBSP.

Avaliações paralelas foram feitas com conjugado *C. septicum* RP-81⁹ e *C. chauvoei* RP-78¹⁰ para confirmação dos resultados obtidos. Para titulação os conjugados foram diluídos com solução a 2% de Tween 80 em PBS pH 7,2. Utilizou-se, como controle de especificidade, esfregaços de antígenos heterólogos aos conjugados testados. A mais alta diluição mostrando clara distinção entre os controles positivos e negativos foi considerada como concentração adequada para testes de diagnóstico.

3.5.1 COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

Lâminas contendo esfregaços de *C. septicum* e *C. chauvoei*, 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 (GALVÃO, 1984) por 10 minutos, enxaguadas por três vezes em PBS pH 7,2 e montadas com glicerol ajustado ao pH 7,2 com PBS.

Paralelamente, uma lâmina foi corada com as mesmas diluições de um dos conjugados, lavada com tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e montada com glicerol tamponado pH 9,0.

3.5.2 INIBIÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Esfregaços de culturas de *C. septicum* e *C. chauvoei* foram incubados em câmara úmida a 37°C por 45 minutos com soro anti-*C. septicum* e anti-*C. chauvoei*, respectivamente, e corados como descrito anteriormente.

⁹ Wellcome Research Laboratories - Beckenham Kent - England

¹⁰ *ibid.*

3.5.3 ADSORÇÃO

Os conjugados cujos soros foram purificados com ácido caprílico foram adsorvidos, na diluição de 1:2, com massa bacteriana dos antígenos heterólogos, a 4°C, por 18-20 horas. Após centrifugação a 1000g sob refrigeração por 30 minutos e retirada da massa bacteriana, os conjugados foram novamente titulados.

3.5.4 MICROSCOPIA

Foi utilizado Microscópio Zeiss, binocular, "Standard WL"¹¹, objetiva de imersão 40X 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.

¹¹ CARL ZEISS. Companhia Ótica e Mecânica Oberkochen. Alemanha Ocidental

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas bacterianas obtidas em meio contendo 0,5% de glicose e 0,1% de cisteína apresentaram, no período de 18 horas, crescimento satisfatório, verificado por turbidez do meio, presença de gás e ausência de auto-aglutinação.

A utilização de meios de cultura, enriquecidos com glicose e cisteína, demonstrou um expressivo crescimento bacteriano, confirmando as afirmativas de STERNE & BATTY (1975) e SMITH & HOLDEMAN (1968), porém observou-se a formação de depósito no fundo dos tubos, o que também foi constatado por ROBERTSON (1919/20).

A maior parte dos antígenos elaborados para produção de bacterinas e/ou testes de aglutinação é produzida após crescimento em meios líquidos onde há o acréscimo de glicose, na maioria das vezes na concentração final de 1% (HENDERSON, 1932; HENDERSON, 1934; MOUSSA, 1959; BATTY & WALKER, 1963a) ou a 0,5% (DANESCU et al, 1978). A cisteína também exerce efeito favorável no crescimento desses microorganismos devido a provável demanda dessas espécies pela mesma (SMITH & HOLDEMAN, 1968).

O período de crescimento de 18 horas também foi utilizado por SHIRASAKA & BENNO (1982), sendo um período maior que os usados por HENDERSON (1932), HENDERSON (1934), MOUSSA (1959) e BATTY & WALKER (1963a). Em virtude do abundante crescimento bacteriano ocorrido no presente trabalho, o tempo de incubação das culturas poderia ter sido menor e, talvez, seis a oito horas de cultivo fossem suficientes para obtenção das formas vegetativas. CLAUS & MACHEAK (1972) sugeriram o período de crescimento máximo de oito horas.

A concentração de antígeno utilizada, de acordo com JAIN et al (1987), correspondendo ao tubo sete da escala de McFarland e com contagem bacteriana de $3,2 \times 10^8$ células/ml (*C. septicum*) e $3,4 \times 10^8$ células/ml (*C. chauvoei*), mostrou-se eficiente para obtenção do soro imune, embora inferior às concentrações dos antígenos utilizados por ROBERTSON (1919/20), HENDERSON

(1932), HENDERSON (1934), MOUSSA (1959) e BATTY & WALKER (1963a).

A inoculação do antígeno com adjuvante completo de Freund no coxim plantar levou os animais à claudicação em virtude de severa inflamação local e ulceração de caráter purulento. O uso destes sítios, embora facilitasse as inoculações intradérmicas, mostrou-se inadequado em razão do estresse gerado pela dor, exacerbada pela manutenção dos animais em gaiolas. As inoculações no dorso apresentaram-se menos estressantes, apesar de também originarem lesões.

O teste de aglutinação em placa mostrou-se satisfatório. As diluições foram realizadas até a obtenção de títulos de 1:800, resultados superiores aos encontrados por BATTY & WALKER (1963a), DANESCU et al (1978) e JAIN et al (1987).

Os testes de aglutinação para *C. septicum* e *C. chauvoei* são controversos em função da auto-aglutinação observada (FELIX & ROBERTSON, 1928; HENDERSON, 1932; MOUSSA, 1959; SMITH & HOLDEMAN, 1968; CLAUS & MACHEAK, 1972). Neste estudo não houve auto-aglutinação no preparo dos antígenos, apesar do uso de soluções salinas a 0,85%. Uma vez que não foram observados cuidados na adição de formoldeído e o pH das suspensões não foi ajustado, a estabilidade dos antígenos aqui produzidos deveu-se, provavelmente, à utilização de meios tamponados, uso de culturas recentes e suspensões com formas vegetativas puras.

O caráter instável das suspensões antigênicas foi superado por alguns autores com o uso de concentrações salinas reduzidas (FELIX & ROBERTSON, 1928; MOUSSA, 1959; SMITH & HOLDEMAN, 1968), adição de formalina com o mínimo de agitação possível (CLAUS & MACHEAK, 1972), utilização de culturas novas com crescimento rápido (CLAUS & MACHEAK, 1972; SMITH & HOLDEMAN, 1968), pH das suspensões ajustado para 6,8 a 7,2 e crescimento bacteriano em meios tamponados (SMITH & HOLDEMAN, 1968). Deve-se lembrar que, segundo MOUSSA (1959), suspensões mistas são menos estáveis.

Apesar de THOROLD (1953) ter concluído que a técnica de aglutinação foi imprópria para avaliação de vacinas, CLAUS & MACHEAK (1972) demonstraram potencialidade na mesma e JAIN et al (1987) observaram concordância entre os títulos de aglutinação e resposta à vacinação em bovinos e caprinos

vacinados. No presente trabalho o uso do teste restringiu-se à verificação de anticorpos no soro de seis animais.

Na TABELA 1 encontram-se os resultados do fracionamento de imunoglobulinas do soro anti-*C. septicum* e anti-*C. chauvoei* pelas duas técnicas utilizadas neste trabalho.

TABELA 1 Dosagem de proteínas (g/100ml) do soro imune total e dos soros precipitados com sulfato de amônio e ácido caprílico/sulfato de amônio

ESPÉCIES	SORO TOTAL		SORO PRECIPITADO COM SULFATO DE AMÔNIO		SORO PRECIPITADO COM ÁCIDO CAPRÍLICO	
	Refratômetro	Método de LOWRY	Refratômetro	Método de LOWRY	Refratômetro	Método de LOWRY
<i>C. septicum</i>	7,8	7,35	2,0	1,48	2,2	1,76
<i>C. chauvoei</i>	8,0	7,61	1,8	1,23	2,0	1,94

A técnica para fracionamento de imunoglobulinas com ácido caprílico (McKINNEY & PARKINSON, 1987) mostrou-se superior à técnica realizada com sulfato de amônio (GOLDMAN, 1968) em relação à quantidade de imunoglobulinas purificadas obtidas. Não foram realizados testes para verificação da pureza das amostras. As concentrações proteicas dos soros imunes foram de 1,23 a 1,94g/100ml, resultados estes semelhantes aos obtidos por DANESCU et al (1978) na produção de soro imune para *Clostridium sp.*, sendo necessário destacar que aqui, neste trabalho, as concentrações dos soros precipitados com ácido caprílico foram ligeiramente superiores.

Para remoção do sulfato de amônio residual, quando utilizada a técnica de precipitação por esse sal, foi necessário dois a quatro dias, período superior aos verificados por KAUFMAN & CHERRY (1961) e HEBERT & PITTMAN (1965), onde a eliminação do sulfato foi obtida em quatro e 24 horas, respectivamente.

A discrepância entre os períodos utilizados é de difícil avaliação visto que, entre este estudo e os autores consultados, houve semelhança quanto ao diâmetro e espessura dos tubos de diálise

e os volumes de PBS para diálise aqui usados foram maiores. O tempo reduzido encontrado por HEBERT & PITTMAN (1965) poderia ser explicado pelas trocas mais freqüentes da solução salina, apesar da maior proporção de PBS usada neste trabalho reduzir consideravelmente esta possibilidade.

O uso de 25µg de FITC por mg de proteína, neste trabalho, concorda com WOOD et al (1965), sugerindo que 50µg por mg de proteína relatado por vários autores (RIGGS et al, 1958; STERNE & BATTY, 1975; DANESCU et al, 1978; HUDSON & HAY, 1989) seriam excessivos.

O uso de cromatografia de troca iônica para retirada de colorações inespecíficas foi recomendado por WOOD et al(1965) e GOLDMAN (1968). No presente trabalho o emprego da coluna de DEAE-celulose não apresentou resultados satisfatórios, verificando-se queda acentuada na concentração proteica. A utilização de filtração em gel aliada à posterior diálise, também utilizados por BATTY & WALKER (1963a) e STERNE & BATTY (1975), removeu com eficiência o FITC livre e eliminou a maior parte das fluorescências inespecíficas.

O período de diálise neste estudo foi superior aos realizados por BATTY & WALKER (1963a) e semelhante ao sugerido por GOLDMAN (1968). Estes achados sugerem uma grande quantidade de FITC livre, sendo provável que a concentração de 20µg por mg de proteína, como sugeriu DE LUCA (1984), seja suficiente para a produção de bons conjugados. Deve-se considerar também que, segundo PITTMAN et al (1967), a pureza do corante influencia as colorações.

A altura da coluna de Sephadex para eluição dos conjugados mostrou-se suficiente, correspondendo parcialmente as afirmações de DE LUCA (1984) que sugeriu o preparo de coluna de 1,5cm de diâmetro com 2cm de altura para cada ml de proteína conjugada.

Os conjugados cujos soros imunes foram precipitados com sulfato de amônio obtiveram títulos de 1:20. Os títulos obtidos a partir dos soros purificados com ácido caprílico/sulfato de amônio foram de 1:160. Estes resultados demonstram a grande eficiência da técnica de purificação de IgG com ácido caprílico, visto que os títulos encontrados com o uso da mesma foram oito vezes maiores do que os obtidos com sulfato de amônio. Segundo MCKINNEY & PARKINSON (1987), o método de purificação com



ácido caprílico recupera 80-90% da fração IgG do soro imune, embora a pureza das amostras seja igual à produzida em soros fracionados com sulfato de amônio/cromatografia de troca iônica.

O efeito da alcalinidade na intensidade da fluorescência não foi constatado neste experimento. Foram testadas as três últimas diluições de um dos conjugados produzidos. A lâmina lavada com tampão carbonato pH 9,0 e montada com glicerol tamponado pH 9,0 não demonstrou qualquer diferença quando comparada com a lâmina lavada e montada da forma usual, resultados estes diferentes dos encontrados por PITAL & JANOWITZ (1963) e HIRAMOTO & HAMLIN (1965).

A viabilidade dos esfregaços fixados e estocados à -18°C mostrou-se satisfatória para lâminas guardadas por períodos de um a seis meses, porém lâminas em estoque há 12 meses mostraram lise celular. PITTMAN et al (1967) obtiveram bons resultados com lâminas fixadas com metanol por dois meses à temperatura de -10°C e 12 meses à temperatura de -70°C.

A inibição da imunofluorescência foi realizada com as três últimas diluições dos conjugados analisados. Embora os resultados tenham sido mais expressivos nos dois conjugados de *C. septicum*, foi verificada inibição nítida também nos dois conjugados de *C. chauvoei*, confirmando assim a especificidade dos mesmos.

Após adsorção com os antígenos heterólogos (*C. septicum* e *C. chauvoei*) os títulos dos conjugados preparados a partir de soros precipitados com ácido caprílico foram de 1:40. O conjugado de *C. septicum* adsorvido com antígeno homólogo não apresentou fluorescência.

A redução expressiva dos títulos destes conjugados, no presente estudo, pode ter ocorrido devido a utilização de grande quantidade de bactérias para a adsorção. Segundo GOLDMAN (1968), o antígeno heterólogo usado na adsorção deve conter um número reduzido de microorganismos, visto que os conjugados são mais diluídos que o soro original e que é comum, quando soros heterólogos são utilizados, a redução do título em função de perdas inespecíficas.

A redução dos títulos, neste experimento, também pode ter ocorrido devido à presença do antígeno "S", comum ao *C.*

septicum e ao *C. chauvoei*, responsável por reações cruzadas entre estes microorganismos (MOUSSA, 1959; SMITH & HOLDEMAN, 1968). Apesar do preparo do antígeno ter sido realizado com culturas novas, após verificação da ausência de esporos pela técnica de Gram, a inativação das mesmas pelo calor pode não ter sido eficiente e algumas células terem esporulado antes da posterior inativação pelo formol. O uso de colorações específicas para esporos, tais como os métodos de Moeller, Dorner ou Wirtz-Conklin, poderiam ter evidenciado com maior precisão a presença desses esporos.

ROBERTSON & FELIX (1930) e STERNE & BATTY (1975) consideraram o antígeno "O" como o principal fator indutor de imunidade. Em virtude do *C. septicum*, baseado em seu antígeno "O", ter dois grupos sorológicos distintos (HENDERSON, 1934; MOUSSA, 1959; STERNE & BATTY, 1975) ou três (SHIRASAKA et al, 1983), não apresentando reações cruzadas entre si nos testes de imunofluorescência (BATTY & WALKER, 1963a e b), o conjugado de *C. septicum* produzido no presente trabalho foi posto frente às amostras de *C. septicum* usadas por LOPES (1977), apresentando fluorescências positivas.

É necessário, entretanto, a caracterização sorológica em maior número de amostras de *C. septicum*, visando um estudo epizootiológico mais profundo para melhor classificação dos sorotipos encontrados no país.

5 CONCLUSÕES

De acordo com o presente trabalho conclui-se que:

- Meios de cultura enriquecidos com 0,5% de glicose e 0,1% de cisteína propiciam crescimento rápido e expressivo de *C. septicum* e *C. chauvoei*.
- Antígenos contendo $3,2 \times 10^8$ a $3,4 \times 10^8$ células por ml são suficientes para produção de soro imune e utilização em testes de aglutinação.
- Os conjugados preparados a partir de soros imunes purificados com ácido caprílico/sulfato de amônio obtiveram títulos superiores aos produzidos por precipitação com sulfato de amônio
- Os conjugados produzidos para identificação de *C. septicum* e *C. chauvoei* através da técnica de imunofluorescência direta apresentaram resultados satisfatórios, podendo ser utilizados para fins de diagnóstico.

SUMMARY

The production of conjugates anti-*Clostridium septicum* and anti-*Clostridium chauvoei* for direct immunofluorescence testing is described. The culture medium used, enriched with glucose 0,5% and cysteine 0,1%, propitiated fast and expressive *C. septicum* and *C. chauvoei*'s growing. Antigens containing $3,2 \times 10^8$ to $3,4 \times 10^8$ cells/ml were considered satisfactory for immune sera production and agglutination tests. Conjugates prepared from immune sera fractionated by combination of caprylic acid and ammonium sulfate precipitation exhibited eight times higher titres than conjugates prepared by ammonium sulfate precipitation. Heterologous antigens and field materials sent to UFMG's Veterinary School were tested. Fluorescent inibition tests and heterologous and homologous antigens adsorption tests were performed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDEHALI, M.; MOOSAN, M., AVAZPOOR, J. Isolation, typing and rapid diagnosis of pathogenic clostridia from infected animals in Iran. *Archives d'Institut Razi*, v.38/39, p.35-42, 1988.
- BALDASSI, L., HIPÓLITO, M., CALLI, E.M.B. et al. Observações sobre a incidência da gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-79, no estado de São Paulo. *O Biológico*, v.51, n.6, p.161-165, 1985.
- BARNES, D. M., BERGELAND, M.E., HIGBEE, J.M. Differential diagnosis of clostridial myonecrosis. *Canadian Veterinary Journal*, v.16, n.12, p.357-359, 1975.
- BATTY, I., WALKER, P.D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v.85, n.2, p.517-520, 1963a.
- BATTY, I., WALKER, P.D. Fluorescent labelled clostridial antisera as specific strains. *Bulletin Office International Epizooties*, v.59, n.9/10, p.1499-1513, 1963b.
- BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 23. ed. São Paulo: Melhoramentos. 1982. p.833: 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.
- CLAUS, K.D., MACHEAK, M.E. 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.
- DANESCU, A., CIRSTET, I., TOMA, A.N. 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.

- DE LUCA, D. Immunofluorescence analysis. In: MARCHALONIS, J.J., WARR, G.W. *Antibody as a tool: the applications of immunochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 1984. p.189-231.
- FELIX, A., ROBERTSON, M. Serological studies in the group of the spore-bearing anaerobes. I. The qualitative analysis of the bacterial antigens of *B. oedematis maligni* (*Vibrion septique*) and *B. tetani*. *The British Journal of Experimental Pathology*, v. 9, n.1, p.06-18, 1928.
- GALVÃO, C.L. *Diagnóstico da infecção genital do herpes vírus bovino 1 (HVB 1) pelos métodos de isolamento e imunofluorescência direta*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1984. 42p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- GOLDMAN, M. *Fluorescent antibody methods*. New York: Academic Press, 1968. 303p.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v.48, n.2, p.422-427, 1972.
- HEBERT, G.A., PITTMAN, M.S. Factors affecting removal of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from salt fractionated serum globulins employing a spectrophotometric procedure for determination of sulfate. *Health Laboratory Science*, v.2, n.1, p.48-53, 1965.
- HENDERSON, D.W. Experiments with the "O" antigen of *Clostridium oedematis maligni* (*Vibrion septique*). *British Journal of Experimental Pathology*, v.15, n.3, p.166-175, 1934.
- HENDERSON, D.W. Studies on *Clostridium chauvoei* I - The analysis of the "H" and "O" antigens of *C. chauvoei*. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 13, n.5, p.412-20, 1932.
- HIRAMOTO, R.N., HAMLIN, M. Detection of two antibodies in single plasma cells by the paired fluorescence technique. *Journal of Immunology*, v. 89, n.2, p.545-554, 1965.

- HUDSON, L., HAY, F.C. *Practical immunology*. 3. ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989. p.1-33: The basic techniques, p.34-85: Antibody as a probe.
- JAIN, V.C., TANWANI, S.K., MOGHE, M.N. A note on the use of agglutination test for assessing antibodies produced by *Clostridium chauvoei*. *Haryana Veterinary*, v. 26, n.1/2, p.54-55, 1987.
- KAUFMAN, L., CHERRY, W.B. Technical factors affecting the preparation of fluorescent antibody reagents. *Journal of Immunology*, v.87, n.1, p.72-9, 1961.
- LOPES, A.A. *Avaliação de imunógenos anti-carbúnculo sintomático em uso no Brasil*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1977. 59p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- McKINNEY, M.M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *Journal of Immunological Methods*, v.96, p.271-278, 1987.
- MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 77, n.2, p.341-350, 1959.
- NERVIG, R.M., MALOY, S.E., CLAUS, K.D. et al. *Clostridium septicum* infection in cattle in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 179, n.5, p.479, 1981.
- PITAL, A., JANOWITZ, S.L. Enhancement of staining intensity in the fluorescent-antibody reaction. *Journal of Bacteriology*, v. 96, n.2, p.888-889, 1963.
- PITTMAN, B., HEBERT, G.A., CHERRY, W.B. et al. The quantitation of nonspecific staining as a guide for improvement of fluorescent antibody conjugates. *Journal of Immunology*, v.98, n.6, p.1196-1203, 1967.
- PRESCOTT, S.C., BREED, R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *Journal of Infectious Diseases*, v.7, n.5, p.632-640, 1910.

- RIGGS, J.L., SEIWALD, R.J., BURCKHALTER, J.H. et al. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *American Journal of Pathology*, v.34, n.6, p.1081-1097, 1958.
- ROBERTSON, M. Serological groupings of *Vibrion septique* and their relation to the production of toxin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v.23, n.2, p.153-170, 1919/1920.
- ROBERTSON, M., FELIX, A. Serological studies in the group of the spore bearings anaerobes. II - In vivo experiments with and "O" immune serum to *Vibrion septique* devoid of antitoxin content. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 11, n.1, p.14-23, 1930.
- SHIRASAKA, S., BENNO, Y. Isolation of *Clostridium septicum* from diseased chickens in broiler farms. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v.44, n.5, p.807-9, 1982.
- SHIRASAKA, S., TERANISHI, H., BENNO, Y. et al. Serological characterization of *Clostridium septicum* strains isolated from clinical materials of chickens and cows. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v.45, n.6, p.861-863, 1983.
- SMITH, L.D., HOLDEMAN, L.V. *The pathogenic anaerobic bacteria*. Springfield: Charles C. Thomas, 1968. p.349-373.
- STERNE, M. Algunos aspectos del diagnostico y control de las enfermedades por clostridios. *Veterinaria*, v.15, n.70, p.73-77, 1977.
- STERNE, M., BATTY, I. *Pathogenic clostridia*. London: Butterworths, 1975. 144p.
- THOROLD, P.W. The immunity to *Cl. chauvoei* produced by vaccine prepared from cellophane sac cultures. *British Veterinary Journal*, v. 109, n.4, p.302-309, 1953.
- WARR, G.W. Purification of antibodies. In: MARCHALONIS, J.J. WARR, G.W. *Antibody as a tool: the applications of immunochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 1984. p.59-96.
- WILLIAMS, B.M. Clostridial myositis in cattle: bacteriology and gross pathology. *Veterinary Record*, v.100, n.5, p.90-91, 1977.

WOOD, B.T., THOMPSON, S.H., GOLDSTEIN, G. Fluorescent antibody staining. III. Preparation of fluorescein-isothiocyanate - labelled antibodies. *Journal of Immunology*, v.95, n.2, p.225-229, 1965.