

PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE CONJUGADOS FLUORESCENTES PARA DIAGNOSTICO DE MANCHA Y GANGRENA GASEOSA

R.A. Assis^{1*}, F.C. F. Lobato¹, L.D. Dias¹, F.A. Uza², N.E. Martins¹, N. Silva¹

Palabras clave: mancha, gangrena gaseosa, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, inmunofluorescencia.

RESUMEN -La mancha y la gangrena gaseosa son enfermedades de bovinos, ovinos, caprinos y otras especies animales producidas por *Clostridium chauvoei*, y por *C. Chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii* y *Clostridium perfringens*, respectivamente. Este trabajo consistió en la producción y evaluación de conjugados fluorescentes anti-*C. chauvoei* y anti-*C. septicum* para la técnica de inmunofluorescencia directa. Los anticuerpos fueron producidos en conejos, precipitados con solución saturada de sulfato amonio y purificados en columna de DEAE/celulosa. Una vez conjugados con isotiocianato de fluorocerna, los anticuerpos fueron purificados en columna de Sephadex. Los conjugados anti-*C.septicum* y anti-*C. chauvoei* no presentaron reacciones cruzadas entre sí ni cuando se los evaluó con improntas de *C. novyi*, *C. sordellii* y *C. perfringens*.

Key words: black leg, malignant oedema, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, immunofluorescence.

SUMMARY PRODUCTION AND EVALUATION OF FLUORESCENT CONJUGATES FOR THE DIAGNOSIS OF BOTH BLACK LEG AND MALIGNANT OEDEMA

-Black leg and malignant oedema are diseases of cattle, sheep, goats and other animal species. produced by *Clostridium chauvoei* and by *C. chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii* and *Clostridium perfringens*. Fluorescent conjugates anti-*C. chauvoei* and anti-*C. septicum* were produced and evaluated for the direct immunofluorescence technique. The antibodies were produced in rabbits, precipitated with ammonium sulphate saturated solution and purified in a DEAE/cellulose column; when conjugated with fluorescein isothiocyanate. the antibodies were purified in a sephadex column. The anti-*C. septicum* and anti-*C. chauvoei* conjugates did not show cross reactions when evaluated against each other or on smears of *C. novyi*, *C. sordellii* and *C. septicum*.

INTRODUCCIÓN -La mancha y la gangrena gaseosa son enfermedades resultantes de la multiplicación y producción de toxinas por bacterias del género *Clostridium* en la musculatura y tejido subcutáneo de bovinos, ovinos y caprinos principalmente con la consecuente lesión local y toxemia. La mancha es producida por *Clostridium chauvoei* solamente, mientras que la gangrena gaseosa es usualmente producida por uno o más de los siguientes microorganismos: *C. chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii* y *Clostridium perfringens*. Varios factores tales como intervenciones quirúrgicas, traumas, isquemias vasculares, tumores y otras infecciones bacterianas aerobias y/o anaerobias pueden desencadenar estas infecciones. Estos factores

¹ Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva. Escuela de Veterinaria. Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antonio Carlos. 6627 -Pampulha, CEP 30123-970. Belo Horizonte. Minas Gerais. Brasil. E-mail: assisra@yahoo.com

². Unidad de Salud Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC 277 (8400) Bariloche. Argentina.

* Autor para correspondencia

propician una disminución en el oxígeno molecular, llevando a un bajo potencial de óxido-reducción en los tejidos, favoreciendo la germinación de las esporas de los clostridios allí localizadas, con la consecuente producción de toxinas⁸.

Los perjuicios económicos provocados por la mancha y la gangrena gaseosa son altos¹. Por ejemplo, en una encuesta realizada en la Argentina en 1999 incluyendo la mayoría de los laboratorios de diagnóstico y/o producción de biológicos de la Red Servicio Nacional de Sanidad Animal, los miembros de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico y las Facultades de Veterinaria de Argentina, se verificó que del total de especímenes clínicos evaluados, fueron aislados, entre otros clostridios, 23,5% de cada uno de *C. chauvoei*, *C. septicum* y *C. perfringens*³. En el Brasil, según el Servicio de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Abastecimiento fueron registrados en el período de 1990 a 1999, 8098 focos de mancha y gangrena con 7623 muertes (Olinda; S.. comunicación personal).

Tradicionalmente, la confirmación del diagnóstico de la mancha y la gangrena gaseosa se realiza por el cultivo y aislamiento de los gérmenes intervinientes. Sin embargo, frecuentemente estos procedimientos no son exitosos debido a dificultades en la toma y envío de muestras y en el procesamiento de las mismas en el laboratorio. La mayoría de los clostridios involucrados en la mancha y la gangrena gaseosa son extremadamente sensibles al oxígeno por lo que su crecimiento se ve fácilmente superado por el de otros microorganismos presentes en las muestras. Además, el cultivo e identificación de los clostridios lleva de 4 días a una semana y la diferenciación entre *C. chauvoei* y *C. septicum* se dificulta debido a la similitud de los caracteres morfológicos y bioquímicos de ambos¹⁰. De ahí la importancia de técnicas como la inmunofluorescencia directa que permite realizar la detección de diferentes especies clostridiales en improntas de tejidos y/o cultivos. Esta técnica es rápida (aproximadamente 1 hora), específica y las improntas, una vez secas, pueden enviarse al laboratorio sin necesidad de condiciones especiales de transporte, conservándose inalteradas varios días a temperatura ambiente.

La información publicada sobre producción y evaluación de conjugados clostridiales fluorescentes es sumamente escasa, por lo que se describe acá la producción y evaluación de conjugados fluorescentes anti-*C. septicum* y anti-*C. chauvoei* para su uso en la técnica de inmunofluorescencia directa.

MATERIALES y METODOS -Se utilizaron seis conejos Neo Zelandeses blancos de aproximadamente 2,2 kg cada uno. Para la preparación de los inóculos fueron utilizados *C. septicum* (cepa 12464) y *C. chauvoei* (cepa 10092) de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, Estados Unidos de América). Las cepas fueron sembradas en caldo de carne cocida (Oxoid CM 81, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 48 horas en anaerobiosis, luego de lo cual cada muestra fue repicada en caldo soja tripticasa e incubada a 37°C por 18 horas en anaerobiosis. Comprobado el crecimiento y la pureza por medio tinción de Gram los cultivos se centrifugaron a 1000 x g, a 4°C, durante 30 minutos y el sobrenadante descartado. Los precipitados fueron lavados cinco veces en solución estéril de tampón de fosfato pH 7,2 (PBS) con 0,5% de formol y suspendidos en la misma solución a una turbidez equivalente al tubo 7 de la escala de Mc Farland⁴, con una concentración aproximada de $2,1 \times 10^9$ células/mi. Las suspensiones fueron mantenidas en esta suspensión a 37°C por 24 horas. Después del control de esterilidad en caldo cerebro-corazón y agar sangre a 37°C por 48 horas en anaerobiosis, parte de las suspensiones de *C. chauvoei* y *C. septicum* fueron conservadas a 4° C para ser utilizadas luego como antígeno en la detección de anticuerpos. El resto de las suspensiones fueron emulsionadas en volúmenes iguales con adyuvante completo de Freund e inoculadas intradérmicamente en el dorso de los conejos en volúmenes de 0,4 ml por animal y por día, los días 0, 7, 14, 21, 28 y 42.

El día 35 se obtuvo una muestra de sangre de los conejos para determinar presencia de anticuerpos anti- *C. Septicum* y anti-*C. chauvoei*, a través del método de aglutinación en placa. Para esto se realizaron diluciones crecientes del suero (entre 11100 y 1112800) y se las enfrentó en volúmenes iguales con el antígeno utilizado en los inóculos, sobre placa de vidrio. Las lecturas fueron realizadas después de movimientos suaves de rotación por 2 minutos, considerándose positivo el resultado cuando en ese tiempo se obtuvo aglutinación macroscópica⁷. En el día 42, los animales recibieron una segunda dosis de la suspensión ya los 57 días, después de medir anticuerpos por el mismo procedimiento descrito para el día 35, se realizó la sangría total de los animales por punción cardíaca y los sueros fueron conservados a -18°C hasta su utilización.

Las inmunoglobulinas fueron obtenidas a través de la precipitación de los sueros con solución saturada de sulfato de amonio, diálisis en PBs pH 7,2⁹ y pasaje en columna de DEAE/celulosa con 4 cm de diámetro, equilibrada y eluida con tampón Tris/HCL pH 8,8. Los dosajes proteicos fueron realizados en espectrofotómetro a 560nm de absorbancia por el método de biuret (Ferreira, A.M.J, comunicación personal) y comparadas a una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en la concentración de 10mg/ml.

La conjugación de las inmunoglobulinas con isotiocianato de fluoresceína (FITC-sigma, St. Louis, Estados Unidos de América) fue hecha en la proporción de 25µg FITC por cada mg de proteína¹¹. Los conjugados fueron pasados por una columna de Sephadex G-50 de 1 cm de diámetro, equilibrada y eluida con PBS pH 7,2 para separación de las fracciones no conjugadas. Las fracciones obtenidas de los conjugados fueron diluidas con glicerol en la proporción de 1:1 y conservadas a -20°C hasta su uso. Los conjugados anti-*C. Septicum* y anti-*C. chauvoei* fueron evaluados por la técnica de inmunofluorescencia directa², en improntas de *C. septicum* y *C. chauvoei*, respectivamente, para determinación de la sensibilidad, utilizando diluciones crecientes de cada conjugado (entre 1/2 y 1/16384). Se seleccionó la mayor dilución de los conjugados que produjo fluorescencia de los microorganismos con mínima coloración de fondo. Luego se procesaron, a la dilución elegida, 5 cepas de *C. chauvoei* (LARA- PL, ATCC-10092, Valée, y dos aislamientos de campo) y 5 de *C. septicum* (LARA-PL, ATCC-12464, Hertape, y dos aislamientos de campo), pertenecientes a un cepario de clostridios del laboratorio de anaerobios de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais. Una vez determinada la dilución de trabajo (sensibilidad), se evaluó la especificidad. Para esto se enfrentó cada conjugado a improntas de *C. septicum* (ATCC-12464), *C. chauvoei* (ATCC- 10092), *C. perfringens* (ATCC-3624) *C. novyi* (ATCC - 19402) y *C. sordellii* (ATCC-9714).

RESULTADOS- En la sangría realizada el día 35, los títulos obtenidos para los sueros anti-*C. septicum* y anti-*C. chauvoei* fueron de 1:400 y 1:200, respectivamente. A los 57 días se obtuvo aglutinación hasta la dilución 1:3200 y 1:1600 para los sueros anti-*C. septicum* y anti-*C. chauvoei*, respectivamente. Las concentraciones de inmunoglobulinas obtenidas después de la precipitación de los sueros inmunes con sulfato de amonio fueron de 2,97 y 9,8 g/100 ml para los sueros anti-*C. chauvoei* y anti-*C. septicum*, respectivamente, mientras que las concentraciones de IgG conjugadas con FITC fueron de 2, 15 y 5,5 g/100 ml para los sueros contra estos dos microorganismos, respectivamente. Las diluciones ideales de trabajo de los conjugados anti-*C. septicum* y anti-*C. Chauvoei* fueron 1:512 y 1:256, respectivamente. Se obtuvieron resultados positivos en todas las cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum* probadas con los conjugados específicos en las diluciones de trabajo, mientras que no se observó reacción cruzada entre los conjugados evaluados y ninguna de las otras especies clostridiales utilizadas.

DISCUSIÓN -Los conjugados anti-*C. septicum* y anti-*C. chauvoei* identificaron en forma específica los microorganismos correspondientes, no observándose reacción cruzada entre ellos ni con ninguno de los otros microorganismos estudiados. Estos resultados sugieren que la técnica utilizada fue adecuada para la preparación de los conjugados.

Si bien la misma es laboriosa, los conjugados producidos pueden conservarse por muchos años a -20°C, sin perder su título.

La técnica de inmunofluorescencia directa se realiza habitualmente sobre improntas obtenidas durante la necropsia directamente de los tejidos afectados o sobre improntas de cultivos. Las improntas, una vez obtenidas, pueden conservarse a temperatura ambiente durante varios días, por lo que son sumamente útiles en condiciones de campo, particularmente cuando las muestras demorarán varios días en llegar al laboratorio.

Además, el hecho de que la técnica de inmunofluorescencia lleve aproximadamente 1 hora para realizarse, permite un diagnóstico sumamente rápido de las enfermedades.

Los resultados obtenidos en la prueba de aglutinación en placa en este estudio fueron superiores a los encontrados por Batty y Walker², Danescu et al⁷ y Pinto⁹. Las concentraciones de inmunoglobulinas obtenidas después de la precipitación de los sueros inmunes con sulfato de amonio se mostraron también superiores a los encontrados por Danescu et al⁷ y Pinto⁹, mientras que las concentraciones de IgG conjugadas fueron superiores a los encontrados por Danescu et al⁷ y Pinto⁹. El resultado satisfactorio obtenido con el uso de 25µg de FITC por cada mg de proteína en nuestro trabajo sugiere que los 50 µg/mg de proteína recomendados por varios autores^{5,6,10} serían excesivos. Pinto⁹ comparó dos métodos de precipitación de sueros inmunes, por sulfato de amonio y por ácido caprílico/sulfato de amonio, y concluyó que los conjugados preparados a partir de sueros purificados con ácido caprílico/sulfato de amonio presentan mejores títulos que los precipitados solamente con sulfato de amonio. Sin embargo, en nuestro trabajo fue utilizada solamente la precipitación de los sueros inmunes con sulfato de amonio y los títulos presentados por estos conjugados fueron muy superiores a los obtenidos por Pinto⁹.

A pesar de los significativos perjuicios económicos ocasionados por la alta letalidad de la mancha y la gangrena gaseosa, son pocos los casos notificados de estas enfermedades con confirmación de laboratorio, siendo la mayoría de ellos basados solamente en datos clínicos y/o lesiones de necropsia. Esto ocurre principalmente debido a las complicaciones en la toma, envío al laboratorio y procesamiento de muestras para diagnóstico de enfermedades clostridiales ya la escasez en muchos países del mundo de laboratorios que realizan diagnóstico de enfermedades clostridiales. Con el empleo de la técnica de inmunofluorescencia directa será posible mejorar el diagnóstico, lo que a su vez aumentará las posibilidades de determinar la real prevalencia en nuestro medio de la mancha y la gangrena gaseosa. Esta información, a su vez, será de utilidad para tomar decisiones en la fabricación y uso de vacunas contra estas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo fue financiado por la Fundación de Amparo a la Pesquisa del Estado de Minas Gerais, Centro Nacional de Pesquisa y Desarrollo, Pro-rectoría de Pesquisa (Brasil), la Fundación Internacional para la ciencia (Suecia) y el Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (Argentina. PICT 01-03591)

BIBLIOGRAFIA

1. Baldassi. L.; Hipólito. M.; Calil. E.M.B.. Chiba. S.. Moulin, A.A.P. Observacoes sobre incidencia da gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-79, no estado de sao Paulo. O *Biológico* 51, 161-165, 1985.

2. **Batty. I. y Walker, P.D.** Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by use of fluorescent labelled antibodies. *J. Pathol. Bacteriol.* 85, 517-520, 1963.
3. **Bentancor. A.; Carloni. G.; Kistermann, J.; Alvarez. C. y de Torres. R..** Encuesta preliminar epizootiológica sobre clostridiosis animal en la República Argentina. XII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Mar del Plata, 26 y 27 de noviembre, 1998.
4. **Bier. O.** *Microbiología e Imunología*. 24a edicao. Sao Paulo: Melhoramentos 1234p.
5. **Danescu. A.; Cirstet. I. y Toma. A.N.** Identificarea si tipizarea unor germeni anaerobi patogeni din genul *Clostridium* prin anticorpi fluorescenti. *Lucrarile Institutului de Cercatari Veterinare si Biopreparate "Pasteur"* 14, 175-186, 1978.
6. **Hudson. L. y Hay. F.C.** *Practical immunology*. 3.ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications. P.1-33: The basic techniques, p.34-85: Antibody as a probe.
7. **Jain, V.C.; Tanwani. S.K. y Moghe. M.N.** A note on the use of agglutination test for assessing antibodies produced by *Clostridium chauvoei*. *Haryana Veterinary* 26, 54-55, 1987.
8. **Lobato, F.C.F. y Almeida, A.C.** Clostridioses. *Rev. Bras. Reprod. Animal* 21, 61-69, 1997.
9. **Pinto. M.P. y Abreu. V.L. V.** Comparacao de técnicas para preparo de conjugados anti *Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. *Arq. Bras. Med..Vet.. Zoot.*44, 513-520, 1992.
10. **Sterne, M. y Batty. I.** *Pathogenic clostridia*. London: Butterworths. 144p., 1975.
11. **Wood. B. T.; Thompson. S..H. y Goldstein. G.** Fluorescent antibody staining. III. Preparation of fluorescein-isothiocyanate -labelled antibodies. *J. Immunol.* 95, 225-229, 1965.