

TEIXEIRA

ELISABETH PELOSI TEIXEIRA



o Cat.

ESTUDO DA ADERÊNCIA "IN VITRO" E "IN VIVO" DE  
AMOSTRAS DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPOS A e C

ISOLADAS DE DIFERENTES ORIGENS.

Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida pela candidata Elisabeth Pelosi  
Teixeira e aprovada pela Comissão Julgadora  
Campinas, 02 de abril de 1991

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas na área de Imunologia.

ORIENTADORES: PROF. DR. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO

PROFA. DRA. MARLENE BRAIDE SERAFIM

Campinas - SP

1991

T235e

13677/BC

UNICAMP

## CONTEUDO

|                                                                                         | página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>I INTRODUÇÃO</b> .....                                                               | 01     |
| 1 Introdução .....                                                                      | 03     |
| 2 Estrutura de superfície da célula bacteriana e sua<br>relação com patogenicidade..... | 04     |
| 3 Mecanismos de aderência .....                                                         | 08     |
| 4 <b>Clostridium perfringens</b> .....                                                  | 15     |
| <br><b>II MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                                  | <br>25 |
| 1 Amostras .....                                                                        | 25     |
| 2 Condições e meios de cultivo .....                                                    | 27     |
| 3 Teste de microhemaglutinação .....                                                    | 31     |
| 4 Teste de aderência em células HeLa .....                                              | 32     |
| 5 Testes de inibição da aderência em células HeLa .....                                 | 34     |
| 6 Preparo de antissoro anti- <b>C. perfringens</b> (bactéria<br>total) .....            | 37     |
| 7 Teste de hidrofobicidade .....                                                        | 40     |
| 8 Teste da alça intestinal ligada em leitões .....                                      | 41     |
| 9 Tratamento enzimático da amostra S32 de<br><b>C. perfringens</b> .....                | 44     |
| 10 Tratamento da amostra S32 de <b>C. perfringens</b><br>com metaperiodato .....        | 46     |
| 11 Obtenção de extratos ácidos da amostra S32<br>de <b>C. perfringens</b> .....         | 48     |
| 12 Microscopia eletrônica .....                                                         | 49     |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| III RESULTADOS .....                                               | 56  |
| 1 Testes de hemaglutinação em placas de<br>microtítulo (MHA) ..... | 56  |
| 2 Testes de aderência em células HeLa .....                        | 70  |
| 3 Testes de inibição da aderência em células HeLa .....            | 79  |
| 4 Teste de hidrofobicidade .....                                   | 89  |
| 5 Teste da alça intestinal ligada em leitões .....                 | 91  |
| 6 Microscopia eletrônica .....                                     | 100 |
| IV DISCUSSÃO .....                                                 | 104 |
| V CONCLUSÕES .....                                                 | 133 |
| VI RESUMO .....                                                    | 139 |
| VII SUMMARY .....                                                  | 142 |
| VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                              | 144 |

## I INTRODUÇÃO

A intoxicação alimentar no homem, causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A e a enterocolite necrotizante, doença letal para animais recém-nascidos, produzida geralmente pelo *Clostridium perfringens* tipo C são patologias atribuídas a produção de toxinas. No primeiro caso, as evidências apontam para o envolvimento de uma potente enterotoxina. No que tange a enterocolite necrotizante, produzida pelo tipo C, a chamada toxina  $\beta$  é o fator de virulência determinante da doença. Grande parte destas amostras, produzem uma enterotoxina idêntica a do grupo A mas a participação desta na etiopatogenia da enfermidade em animais precisa ser melhor investigada (SEVERIN, LA FUENTE & STRINGER, 1984; SCOTT & DUNCAN, 1975).

No entanto, nos estudos sobre estas duas patologias, há uma lacuna no que diz respeito a possíveis mecanismos de aderência de formas vegetativas do *Clostridium perfringens* que lhe permitiriam colonizar a mucosa intestinal do homem e animais e, uma vez aí localizado, proceder a esporulação, evento este essencial para a produção e liberação da enterotoxina, além da toxina  $\beta$ , produzida por formas vegetativas do tipo C (UEMURA, 1978; DUNCAN, STRONG & SEBALD, 1972).



Assim, levando-se em conta que a maioria dos estudos bacteriológicos desenvolvidos nos últimos anos dão grande importância aos mecanismos de colonização utilizados pelos mais diversos microrganismos na mediação das doenças, procuramos neste trabalho, esclarecer como dar-se-ia o contato inicial do **Clostridium perfringens** com a mucosa intestinal de animais, a fim de melhor compreendermos os mecanismos de patogenicidade desta bactéria.

Deste modo, os seguintes objetivos delinearam inicialmente a realização da presente pesquisa:

- 1 Pesquisar a presença de possíveis adesinas em amostras de **C. perfringens**, através de provas de hemaglutinação, utilizando hemácias de diferentes origens;
- 2 Estudar o efeito de meios de cultivo, concentração bacteriana, pH, temperatura e presença de manose sobre a reação de hemaglutinação;
- 3 Verificar, por meio de estudos "in vitro", utilizando uma linhagem contínua de células (HeLa), a presença do fenômeno de aderência;
- 4 Pesquisar, através do uso de técnicas de microscopia eletrônica, a presença de estruturas de superfície em células vegetativas de **Clostridium perfringens**;
- 5 Na dependência dos perfis de hemaglutinação obtidos e dos resultados dos testes de aderência em células HeLa, estudar o efeito de possíveis inibidores sobre estes dois tipos de reação;

6 Estudar as características biológicas e químicas de possíveis estruturas presentes sobre a superfície celular do **Clostridium perfringens** através de reprodução experimental da doença e tratamento da bactéria com substâncias específicas que atuem sobre estas estruturas.

Baseados nestes objetivos e com a intenção de facilitar a compreensão deste trabalho, vejamos, resumidamente, alguns detalhes existentes na literatura sobre os mecanismos de aderência empregados por bactérias e as estruturas adesivas que elas utilizam para se fixarem a seus receptores celulares, bem como algumas considerações sobre o **Clostridium perfringens** e sua importância em enteropatias no homem e animais.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS MECANISMOS DE PATOGENICIDADE

### 1 Introdução

Patogenicidade de um microrganismo se caracteriza por sua capacidade de produzir doença em um hospedeiro vegetal ou animal. O desenvolvimento ou não de doença depende do resultado das interações entre o organismo e seu hospedeiro. A maioria destas interações envolve um contato direto entre as superfícies das células microbiana e hospedeira, sendo que os produtos microbianos responsáveis pelos processos patogênicos

são chamados determinantes ou fatores de virulência. E estes, podem ser bastante variáveis em sua natureza química, morfologia e antigenicidade (JAWETZ, MELNICK & ADELBERG, 1974).

Assim, muitos aspectos têm de ser considerados quando se pesquisa a patogenicidade e a virulência de amostras bacterianas. Muitos estudos têm dado grande ênfase ao fato de estruturas de superfície de microrganismos serem de fundamental importância no desenvolvimento de um processo infeccioso e os apêndices por eles utilizados, com a finalidade de adesão, são bastante variáveis em suas características, bem como são diversos os substratos com os quais interagem (JONES, 1977).

## **2 Estruturas de superfície da célula bacteriana e sua relação com patogenicidade**

### **2.1 Introdução**

A ocorrência de apêndices filamentosos não-flagelares entre os mais variados tipos de bactérias indica que estes apêndices apresentam importantes funções nos ambientes naturais em que os microrganismos se desenvolvem, sejam eles o solo, a água, o trato intestinal ou outros (OTTOW, 1975). Assim, duas características importantes destas extensões celulares poderiam ser consideradas em particular:

a) o aumento da superfície ativa demonstrada por estas estruturas, as quais potencialmente melhoram as atividades relacionadas com a membrana tais como, respiração e/ou absorção de nutrientes;

b) seu papel como organelas de fixação, tanto a substratos naturais como a outras bactérias da mesma comunidade.

Essas considerações básicas demonstram que os apêndices não-flagelares podem servir para múltiplas funções e os organismos que os apresentam estão normalmente melhor adaptados às agressões ambientais do que aqueles não equipados com estas estruturas.

## **2.2 Tipos de estruturas de superfície existentes nas células bacterianas**

A maioria dos fatores adesivos conhecidos capacitam as bactérias a aglutinarem hemácias e por isso são chamados de hemaglutininas. Entretanto, eles também as capacitam a aderirem a outros tipos celulares e, como sua função natural está provavelmente relacionada com estes substratos, estes fatores são mais propriamente chamados de adesinas (DUGUID & OLD, 1980).

### 2.2.1 Fímbrias

Um dos primeiros tipos de adesinas estudado foi a fímbria. Este termo é usado para descrever filamentos não-flagelares presentes sobre a superfície da bactéria e conhecidos como organelas responsáveis pela sua propriedade adesiva (DUGUID, ANDERSON & CAMPBELL, 1966; JONES, 1977). Através de provas de hemaglutinação frente a vários tipos de hemácias, as fímbrias foram divididas em tipos 1,2,3 e 4 e são amplamente distribuídas entre as bactérias pertencentes à família **Enterobacteriaceae**. Além dos membros desta família, estruturas do tipo fímbria foram encontradas em outras espécies bacterianas como a **Neisseria gonorrhoeae**, **Neisseria meningitidis** e outras espécies de **Neisseria** não patogênicas (JONES, 1977). Entre as bactérias gram-positivas, só foi relatada a presença de fímbrias entre as corinebactérias (YANAGAWA & HONDA, 1976).

### 2.2.2 Fibrilas

São estruturas de superfície da bactéria às quais também se atribuem propriedades adesivas. Diferem das fímbrias por serem irregulares em forma e dimensão, com pontos discretos de origem sobre a superfície bacteriana. Camadas fibrilares têm sido demonstradas sobre a superfície dos estreptococos orais por GIBBONS et alii (LIELJEMARK & GIBBONS, 1972). O **Streptococcus pyogenes** também produz material

fibrilar de superfície que está associado com as propriedades adesivas seletivas das células estreptocócicas (ELLEN & GIBBONS, 1972).

### **2.2.3 Glicocálices**

São estruturas situadas externamente à parede das bactérias gram-negativas e gram-positivas, caracterizando-se por conterem polissacarídeos em sua constituição. Podem ser divididos em dois tipos: a) as camadas S, compostas por um arranjo regular de subunidades glicoproteicas na superfície celular; b) as cápsulas, compostas por uma matriz fibrosa na superfície da célula, de espessura variável, podendo ser rígidas, flexíveis, integrais ou periféricas, dependendo de suas características (COSTERTON, IRVIN & CHENG, 1981, a e b).

O glicocálice bacteriano é freqüentemente uma matriz polimérica altamente hidratada, perdido facilmente durante as preparações convencionais para microscopia eletrônica. Entretanto, preparações estabilizadas pelo uso de antissoros fornecem evidências para um arranjo radial, formado pelas finas fibras do glicocálice (COSTERTON et alii, 1981 a).

### **2.2.4 Adesinas proteicas não-fimbriais**

Uma variedade de espécies bacterianas produzem adesinas proteicas de superfície que, no entanto, não

apresentam morfologia definida. Essas adesinas têm recebido o nome de "outer membrane proteins" (OMP) ou proteínas secretadas, que permanecem frouxamente associadas à superfície bacteriana (ARP, 1988). A **Bordetella pertussis** produz duas proteínas secretadas envolvidas na adesão às células ciliadas do trato respiratório (TUOMANEN & WEISS, 1985). A adesão da **Neisseria gonorrhoeae** às células epiteliais é mediada não somente por fímbrias mas também por um grupo de "OMPs" denominadas proteínas-II (SWANSON, 1983). O **Staphylococcus aureus**, produz uma proteína de superfície com afinidade específica pela fibronectina (ESPERSEN & CLEMENSEN, 1982). Amostras de **Pasteurella multocida** de diferentes origens também apresentam "OMPs" responsáveis pela adesão desta espécie bacteriana a seu substrato específico (TRUSCOTT & HIRSH, 1988; LU, AFENDIS & PAKES, 1988).

### 3 Mecanismos de aderência

O termo adesão é usado para descrever uma ligação relativamente estável entre a bactéria e uma superfície. Um processo específico de adesão requer a interação de moléculas complementares especializadas, situadas sobre as superfícies da bactéria (adesinas) e de seu substrato na célula hospedeira (ARP, 1988).

### 3.1 Aspectos físico-químicos da adesão

Carga eletrostática e hidrofobicidade são características gerais das superfícies celulares que afetam profundamente a adesão. Glicoproteínas, ancoradas pelas regiões hidrofóbicas dos aminoácidos e glicolipídeos, ancorados na membrana celular por suas caudas hidrofóbicas, representam uma variedade de moléculas carregadas que contribuem para a constituição dos glicocálices das células bacterianas e hospedeira. Sendo composto principalmente de polissacarídeos hidratados, o glicocálice fornece moléculas complexas que funcionam na quimiotaxia e na adesão (COSTERTON et alii, 1981 b).

Estudos de adesão bacteriana indicaram que a ligação irreversível ao substrato era precedida por uma fase reversível e fraca denominada associação. Esta fase inicial de ligação pode ser o efeito combinado resultante de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações iônicas e hidrofóbicas. Em contraste, a adesão irreversível provavelmente requer ligações não-covalentes, numerosas e concentradas entre macromoléculas complexas situadas em superfícies adjacentes (ARP, 1988).

Uma possível explicação físico-química para a interação adesiva entre duas superfícies carregadas negativamente é fornecida pela teoria de DERJAGUIN-LANDAU e



VERWEY-OVERBEEK (ARP, 1988; BUSSCHER & WEERKAMP, 1987). Esta teoria sobre a interação física entre partículas coloidais, estabelece que dois corpos rígidos, de mesma carga, aproximando-se um do outro são afetados por forças atrativas e repulsivas, às quais variam independentemente com a distância entre os corpos. Em distâncias relativamente grandes ( $>10$  nm), há uma força de atração e os corpos são mantidos em um estado de associação fraca, podendo ainda ocorrer uma repulsão. Mas, se a zona intermediária de repulsão puder ser vencida, haverá, então, uma forte força atrativa em distâncias menores do que 1 nm e os corpos poderão estabelecer interações adesivas fortes e relativamente irreversíveis.

Para que efetivamente ocorra uma interação forte, há necessidade de se romper a força repulsiva gerada em distâncias intermediárias entre os corpos em interação. Uma explicação para o rompimento desta força vem da constituição funcional das superfícies das células eucariótica e bacteriana. A superfície da célula epitelial normalmente consiste de microvilosidades, cílios e dobras cobertas por uma complexa camada de glicocálice e muco. A superfície bacteriana é normalmente circundada por polímeros complexos ou apêndices filamentosos que se projetam vários micrômetros no meio adjacente. Estruturas de superfície com raio de curvatura pequeno produzem muito menos forças repulsivas do que a célula toda. Assim, as forças atrativas e repulsivas são diminuídas pela redução no raio de curvatura das superfícies em

interação. Conseqüentemente, apêndices bacterianos de superfície e moléculas do glicocálice bacteriano têm raio de curvatura muito pequeno, e podem se estender através da zona intermediária repulsiva e estabelecer interações ligante-receptor estáveis (JONES, 1983).

### 3.2 Mecanismos de aderência em bactérias gram-positivas

Entre as bactérias gram-positivas, o único gênero conhecido que apresenta fímbrias é o *Corynebacterium*. Neste gênero, as fímbrias exercem função adesiva e foram primeiramente demonstradas em *Corynebacterium renale* por YANAGAWA, OTSUKI & TOKUI, 1968, tendo sido classificadas em três tipos diferentes, através de técnicas sorológicas e bioquímicas. Outras corinebactérias que parasitam o homem e animais também possuem fímbrias, como é o exemplo do *Corynebacterium diphtheriae*, *C. pseudodiphthericum* e *C. kutscheri* (JONES, 1977).

Além do uso de fímbrias como meio de ligação ao substrato, bactérias gram-positivas podem recorrer a outros tipos de estrutura de superfície para colonizarem as células do hospedeiro. É o caso, por exemplo, de alguns estreptococos e lactobacilos que se ligam a superfície das células por meio de adesinas de natureza não-proteica (BEACHEY & OFEK, 1976; BROOKER & FULLER, 1975).

ELLEN & GIBBONS, 1972, observaram que estreptococos desprovidos de camada fibrilar de superfície e do antígeno M associado não apresentavam capacidade adesiva. A tripsinização destruía a camada fibrilar e as propriedades adesivas do **Streptococcus pyogenes** e tinha conseqüências semelhantes para outras espécies de estreptococos. BEACHEY & OFEK, 1976, demonstraram, posteriormente, que a camada fibrilar era destruída por tratamentos que também extraíam ácido lipoteicóico (LTA) e que a adesão estreptocócica era inibida se as células epiteliais eram pré-tratadas com LTA ou se a bactéria era tratada com anticorpo anti-LTA. Na verdade, ácidos teicóicos são encontrados expostos sobre a parede externa de várias espécies gram-positivas e podem ser excretados no fluido sobrenadante de culturas (MARKHAM, KNOX, WICKEN & HEWETT, 1975).

O ácido lipoteicóico também exerce importante papel nos processos adesivos de várias espécies de estafilococos. A mediação da aderência do **Staphylococcus saprophyticus** às células uroepiteliais (TETI, CHIAFALO, TOMASELLO, FARA & MASTROENI, 1987) e do **Staphylococcus aureus** às células do epitélio nasal (ALY, SHINEFIELD, LITZ & MALBACH, 1980), é feita pelo ácido lipoteicóico, que se liga especificamente à fibronectina existente na membrana das células eucarióticas.

As propriedades adesivas dos lactobacilos, por sua vez, estão associadas com uma extensa camada fibrilar rica em

polissacarídeos, sobre a superfície celular (BROOKER & FULLER, 1975). Em comparação com as adesinas dos estreptococos, a capacidade de adesão dos lactobacilos é apenas ligeiramente alterada pelo tratamento com tripsina, mas acentuadamente prejudicada por oxidação pelo periodato e por pepsinização. Por outro lado, a concanavalina A inibe a adesão e também precipita carboidratos liberados pela pepsina, um tratamento que torna a bactéria não-adesiva (FULLER, 1975). Conseqüentemente, um carboidrato que se liga a concanavalina A parece estar envolvido no mecanismo adesivo dos lactobacilos, embora não se saiba ainda se esta camada de carboidrato está ou não associada com alguma outra estrutura que atue como adesina (JONES, 1977).

### **3.3 Mecanismos de aderência em bactérias anaeróbias estritas**

Até o momento ressaltamos os mecanismos utilizados por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas que promovem sua aderência aos mais diversos substratos. Entretanto, quando se trata de bactérias anaeróbias estritas, poucas informações são encontradas na literatura. O *Bacteroides gingivalis*, é um exemplo de bacilo gram-negativo, anaeróbio, não esporulado, causador de doença periodontal, que se liga às células da gengiva através de fímbrias (MCKEE, 1986).

Dentro do gênero *Clostridium* temos também um exemplo de aderência com o *Clostridium thermocellum*, cujo substrato é a celulose. BAYER, KENIG & LAMED, 1983, demonstraram, através de técnicas de microscopia eletrônica, a presença de estruturas de superfície não-fimbriais, sobre a camada externa da célula bacteriana. Estas estruturas apresentavam morfologia nodular e se repetiam periodicamente sobre a superfície bacteriana (BAYER, SETTER & LAMED, 1985; BAYER & LAMED, 1986), mediando sua adesão à celulose e a hemicelulose (WEIGEL & DYKSTRA, 1984).

O *Clostridium perfringens*, por sua vez, já foi demonstrado contornando as vilosidades intestinais de animais recém-nascidos acometidos de enterite necronizante, em uma disposição que sugere fortemente um mecanismo de aderência. ARBUCKLE, 1972, através de técnicas histológicas, demonstrou a presença desta bactéria ligada às vilosidades intestinais de leitões. SIMS, TZIPORI, HAZARD & CARROL, 1985, demonstraram o mesmo fenômeno em potros. KUBO & WATASE, 1985, através de técnicas de microscopia eletrônica, demonstraram a presença de grande número de bacilos circundando uma vilosidade necrótica no intestino de leitões com a mesma enfermidade. Além disso, estes autores evidenciaram a presença de uma material flocoso circundando externamente a parede bacteriana.

Assim, baseados nas observações destes autores, conduzimos nosso trabalho com o intuito de esclarecer os

possíveis mecanismos de patogenicidade do **Clostridium perfringens**, a nível intestinal, em especial no que se refere ao processo de adesão, uma vez que não encontramos na literatura consultada nenhuma informação a este respeito.

#### **4 Clostridium perfringens**

O **Clostridium perfringens** é um bacilo anaeróbico, de extremidades arredondadas, medindo 0,9 a 1,3  $\mu$ m de largura por 3 a 9  $\mu$ m de comprimento, gram-positivo, imóvel e apresenta esporos sub-terminais. As formas vegetativas são bastante pleomórficas, sendo encontradas tanto formas filamentosas como cocóides. Em ágar-sangue, as colônias são geralmente circulares, lisas e de contorno regular, tendo, em média, de 2 a 5 mm de diâmetro (KRIEG & HOLT, 1984).

Esta espécie produz diversas substâncias solúveis que causam uma variedade de efeitos tóxicos "in vivo" e "in vitro". O **Clostridium perfringens** tem sido dividido em cinco tipos (A, B, C, D e E) com base na produção das principais toxinas letais, como demonstrado no Quadro I (KRIEG & HOLT, 1984). Um sexto tipo (tipo F) foi proposto mas é agora considerado como tipo C e a designação de tipo F está sendo abandonada.

Além destas toxinas, o **Clostridium perfringens** produz ainda uma série de substâncias químicas ativas, tais

como desoxirribonuclease, fosfatase ácida, ribonuclease, elastase, hialuronidase, collagenase, amilase, neuraminidase, além de outras (KRIEG & HOLT, 1984).

Quadro I. Classificação do *C. perfringens* por tipos de toxinas produzidas, segundo KRIEG & HOLT, 1984.

| Tipo de                      | Toxina produzida |      |         |      |
|------------------------------|------------------|------|---------|------|
|                              | alfa             | beta | epsilon | iota |
| <b><i>C. perfringens</i></b> |                  |      |         |      |
| A                            | +                | -    | -       | -    |
| B                            | +                | +    | +       | -    |
| C                            | +                | +    | -       | -    |
| D                            | +                | -    | +       | -    |
| E                            | +                | -    | -       | +    |

Dentre as toxinas consideradas principais, a toxina alfa ou lecitinase é uma fosfolipase C que hidroliza lecitina em fosforilcolina e um diglicerídeo; é produzida pelos cinco tipos de *Clostridium perfringens*. A toxina beta, produzida pelos tipos B e C não está completamente caracterizada mas parece ser um polipeptídeo de cadeia única, altamente sensível à tripsina. A toxina epsilon é elaborada pelos tipos B e D na forma de uma prototoxina não tóxica, que é convertida em potente toxina termolábil pela ação de enzimas proteolíticas

como a tripsina. Esta toxina parece aumentar a permeabilidade vascular, possivelmente por ativação da adenilciclase. A toxina iota é produzida somente pelo tipo E e também é elaborada na forma de prototoxina, ativada posteriormente por enzimas proteolíticas. Sua ação tóxica consiste em aumentar a permeabilidade vascular, produzir necrose quando injetada intradermicamente e ser letal quando inoculada por via endovenosa (KRIEG & HOLT, 1984).

Amostras de ***Clostridium perfringens*** do tipo A e algumas cepas do tipo C e D produzem, também, uma enterotoxina (STARK & DUNCAN, 1972; SAKAGUSHI, UEMURA & RIEMANN, 1973) que é um produto do processo de esporulação desta bactéria e, conforme citado anteriormente, parecem ser idênticas biológica e antigenicamente entre si.

#### **4.1 O papel do Clostridium perfringens em algumas patologias intestinais**

##### **4.1.1 Enterocolite necrotizante neonatal**

Enterocolite necrotizante neonatal (NEC) é uma doença de etiologia desconhecida, que acomete crianças recém-nascidas e tem muitas semelhanças com doenças infecciosas entéricas de animais adultos e recém-nascidos. A presença de bacteremia, neutropenia e caráter endêmico tem levado a se



suspeitar de um agente infeccioso na patogenia desta enfermidade (KLIEGMAN, 1985).

Se o patógeno bacteriano é um agente primário, envolvido diretamente na injúria gastrointestinal ou se invade secundariamente a mucosa por outros mecanismos, ainda é motivo de questionamento. *Escherichia coli*, *Klebsiella* e outras enterobactérias foram os organismos predominantemente recuperados de casos de NEC (GUINAN, SCHABERG & BRUHN, 1979). Mais recentemente, espécies de clostrídios e agentes virais têm sido implicados nas NECs. A alta incidência de hemoculturas positivas e síndrome septicêmica têm sugerido que há uma etiologia infecciosa primária nesta patogênese. Entre os organismos isolados incluem-se *E. coli*, *Klebsiella sp*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas sp*, enterovírus e recentemente coronavírus. Desses microrganismos, os clostrídios têm sido os mais implicados na patogênese da NEC e tem-se observado grandes semelhanças desta enterocolite de recém-nascidos com as enterotoxemias clostridiais em animais domésticos (KLIEGMAN, 1979).

#### 4.1.2 Doenças entéricas em animais

As enterocolites produzidas por clostrídios em animais recém-nascidos parecem estar relacionadas, eventualmente, com a falta de imunidade passivamente

transferida pelo colostro. Epidemias de enterite necrotizante são comuns entre leitões recém-nascidos e são devidas à toxina  $\beta$  do **Clostridium perfringens** tipo C. Essas epidemias podem ser prevenidas pela vacinação materna, resultando em produção de anticorpos anti-toxina no colostro. Além disso, a administração de anti-toxina tipo-específica no leitão recém-nascido também evita a enterite.

Enterotoxemias por **Clostridium perfringens** tipo B são semelhantes as dos leitões e afetam tanto bezerros como leitões, sendo também responsáveis pela disenteria em cordeiros. O **Clostridium perfringens** tipo A pode causar enterotoxemia em cordeiros não-desmamados assim como enterite necrótica em frangos e também em leitões (OLUBUNMI & TAYLOR, 1985). O **Clostridium perfringens** tipo D é responsável por enterotoxemias fatais entre cordeiros, cabras e bezerros.

#### 4.1.3 Intoxicação alimentar

As etiologias das doenças referidas como intoxicação alimentar, na maioria das vezes, estão bem definidas. São consideradas intoxicações alimentares o botulismo, a intoxicação por **Clostridium perfringens**, a salmonelose e a intoxicação estafilocócica (BIER, 1980). Destes agentes microbianos, o **Clostridium perfringens** é o que apresenta a maior distribuição ambiental, sendo seus habitats principais o solo e o conteúdo intestinal do homem e animais. Este

microrganismo é conhecido desde o final do século passado, quando apareceram as primeiras suspeitas de intoxicação alimentar causada por este anaeróbio. Entretanto, somente em 1945 estabeleceu-se que a doença no homem era causada por ingestão de alimentos contaminados por **Clostridium perfringens** tipo A (STRINGER, 1985).

A intoxicação alimentar por **Clostridium perfringens** é caracterizada por diarreia e dor abdominal 8 a 24 horas após a ingestão de alimento contendo grande quantidade de células vegetativas. Vômitos, febre, tremores e cefaléia são sintomas raros. A duração da doença é curta e os sintomas geralmente desaparecem dentro de 12 a 24 horas. Óbitos ocorrem ocasionalmente entre pessoas debilitadas, particularmente idosos.

Está bem estabelecido que é uma enterotoxina a responsável pelos sintomas típicos da intoxicação alimentar por **Clostridium perfringens** tipo A. A ingestão de grande número de células vegetativas em um alimento resulta em multiplicação e esporulação no intestino. Após a saída dos esporos do esporângio, há a liberação concomitante da enterotoxina (DUNCAN et alii, 1972).

Estudos de DISCHE & ELEK, 1957, com voluntários humanos, demonstraram a necessidade da presença da bactéria no trato intestinal para reprodução dos sintomas da doença, uma

vez que a administração de um filtrado livre de células bacterianas não reproduzia o quadro de diarreia. Entretanto, estudos de SKJELKVALE & UEMURA, 1977, demonstraram que uma dose oral de enterotoxina purificada (8-10 mg) era capaz de produzir os sintomas típicos de diarreia e dor abdominal em humanos.

#### 4.2 Mecanismos de patogenicidade

Pelo que foi exposto até aqui, podemos observar que o papel da enterotoxina do **C. perfringens** está bem definido na etiologia da intoxicação alimentar por esta bactéria, bem como o envolvimento de suas outras toxinas nos quadros de enterite necrotizante no homem e animais. No entanto, o mecanismo pelo qual o **Clostridium perfringens** se multiplica no intestino, possivelmente através do processo de aderência, a fim de produzir a toxina beta ou chegar ao estágio de esporulação para a produção de enterotoxina, não está claro.

ARBUCKLE, 1972, descreveu em seu trabalho a fixação do **C. perfringens** tipo C às vilosidades intestinais de suíno com doença entérica, usando cortes histológicos do intestino de animais infectados natural ou experimentalmente.

Suas observações macroscópicas mostraram que a lesão mais comum e mais intensa era uma hiperemia da parede intestinal e presença de conteúdo sanguinolento. O jejuno era

a região mais afetada, sendo o íleo e o intestino grosso pouco ou nada comprometidos.

O principal achado microscópico de ARBUCKLE, obtido de secções de jejuno, foi a presença de bacilos em torno do delineamento das vilosidades e no lúmen intestinal. Através de imunofluorescência foi possível observar uma densidade maior de bactérias na região apical das vilosidades e menor no lúmen, indicando que elas podiam se ligar e proliferar nas vilosidades do intestino delgado de suínos.

Os achados de ARBUCKLE foram confirmados pelos estudos de KUBO & WATASE, 1985, que demonstraram, através de microscopia eletrônica, a presença de bacilos aderidos às vilosidades necrosadas de leitões acometidos de enterite. O mesmo fenômeno foi descrito em potros por SIMS et alli, 1985.

Assim, como as adesinas de superfície têm se demonstrado de extrema importância no mecanismo de patogenicidade de várias bactérias gram-negativas, como é o caso da *Escherichia coli* e mesmo de bactérias gram-positivas, como o *Streptococcus pyogenes* e os estreptococos orais, achamos de grande valia tentarmos elucidar o mecanismo pelo qual o *C. perfringens* promove sua adesão à superfície das células do epitélio intestinal de animais sensíveis, incluindo o homem.

De modo geral, para o estudo "in vitro" das propriedades adesivas das bactérias, a maioria dos autores têm lançado mão de duas técnicas básicas (JONES, 1977):

a) testes de hemaglutinação, semi-quantitativos, que medem a capacidade de bactérias adesivas ou de adesinas livres, se ligarem a eritrócitos, causando sua aglutinação;

b) testes de adesão, onde células epiteliais isoladas, células de cultura de tecido, eritrócitos, membranas celulares isoladas, cortes de tecido epitelial ou cultura de órgãos são incubados com a bactéria e realizadas medidas quantitativas da adesão obtida, microscopicamente, pela contagem de células totais, através de colorações simples (Gram, Giemsa ou cristal violeta), ou ainda, quando necessário, por imunofluorescência, imunoperoxidase, marcação radioativa de bactérias, etc.

Além dessas técnicas, adesinas podem ser estudadas por vários outros métodos, tais como microscopia eletrônica, tratamento com antissoro específico, expressão sob diferentes condições de cultivo, estudos de mutantes bem caracterizados, tratamento com inibidores específicos da adesão e estudos de hidrofobicidade.

Assim, neste trabalho, nosso questionamento fundamental foi tentarmos esclarecer se amostras de **Clostridium perfringens** tipo A e C seriam capazes, à semelhança de outros microrganismos, de aderirem "in vivo" e

"in vitro" às células eucarióticas, bem como verificarmos através de que tipo de estrutura esta bactéria executaria sua aderência, o que, até o presente, ainda não foi suficientemente investigado por outros pesquisadores.

## II MATERIAL E MÉTODOS

### 1 Amostras

As amostras de *Clostridium perfringens* utilizadas em nosso trabalho foram divididas em três grupos, segundo sua origem:

Grupo I: amostras de *C. perfringens* isoladas de diversas fontes, em nosso próprio laboratório, apresentadas no Quadro II;

Grupo II: amostras de *C. perfringens* cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. ANTONIO DE MELLO SERRANO, do Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP, apresentadas no Quadro III;

Grupo III: amostras de *C. perfringens* tipo C, cedidas gentilmente pelo Prof. TAKAYOSHI YAMAGISHI, da Universidade de Toyama, no Japão, apresentadas no Quadro IV.

Quadro II - Denominação e origem das amostras de *C. perfringens* pertencentes ao grupo I.

| AMOSTRA | ORIGEM                         |
|---------|--------------------------------|
| S32     | enterite necrotizante em suíno |
| JAB-1   | enterite necrotizante em suíno |
| JAB-2   | enterite necrotizante em suíno |



Quadro III - Denominação e origem das amostras de *C. perfringens* pertencentes ao grupo II.

| AMOSTRA                         | ORIGEM                                                  |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------|
| A,B,C,D<br>I, II, III, VI, VIII | fezes humanas durante surto<br>de intoxicação alimentar |
| 04                              | mortadela                                               |
| 53                              | carne moída bovina                                      |
| 55                              | salsicha                                                |
| 64, 280, 291                    | pernil                                                  |
| 81                              | linguiça de porco fresca                                |
| 97, 143                         | coxinha                                                 |
| 201, 246                        | peixe (corvina)                                         |
| 208, 210, 218, 223              | carne de frango                                         |

Quadro IV - Denominação e origem das amostras de *C. perfringens* pertencentes ao grupo III\*\*.

| AMOSTRA                      | ORIGEM                           |
|------------------------------|----------------------------------|
| CWC-25<br>CWC-26<br>CWC-32   | enterite necrotizante em suíno   |
| VPI-87<br>VPI-115<br>VPI-207 | enterite necrotizante em bezerro |
| 239-F<br>398-F               | enterite necrotizante em humanos |
| KZ-303<br>KZ-304             | fezes de carneiros normais       |

\* Estas amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo C por YAMAGISHI et alii, 1987.

## 2 Condições e meios de cultivo

### 2.1 Condições de cultivo

As amostras de *C. perfringens* isoladas em nosso laboratório foram cultivadas em anaerobiose, usando-se para tal, jarras "GasPak" adaptadas para obtenção de ambiente

anaeróbico que possibilitasse o cultivo da bactéria em condições apropriadas e ao mesmo tempo reduzisse os custos do método.

O processo de adaptação, por nós utilizado, baseou-se no método de passivação do cobre, descrito pelo Prof. JURGENSEN (JURGENSEN & JURGENSEN, 1982), da Universidade Federal Fluminense, RJ. Resumidamente, o processo consistia em usar-se "Bombril" como lâ de aço e comprimidos efervescentes de "Sonrisal" como fonte geradora de dióxido de carbono. Estes comprimidos, no momento do uso, eram colocados em sacos plásticos contendo quantidade suficiente de água destilada para gerar uma atmosfera de aproximadamente 10% de CO<sub>2</sub>. A fonte de cobre utilizada foi uma solução de sulfato de cobre a 5%, na qual o "Bombril" era embebido momentos antes da vedação da jarra.

Juntamente com as placas de Petri semeadas, a jarra recebia também dois controles:

a) controle químico: consistia de um tubo contendo o meio de tioglicolato líquido, tendo como indicador do potencial de oxi-redução, a resazurina;

b) controle biológico: consistia de um tubo contendo o meio de citrato de Simmons semeado com **Pseudomonas aeruginosa**, bactéria aeróbia estrita e que, portanto, não se desenvolve em condições de anaerobiose.

Todos os cultivos de *C. perfringens* realizados em meios sólidos foram incubados em jarra de anaerobiose montada como descrito acima. Os meios líquidos, entretanto, recebiam outro tratamento. Quando não usados imediatamente após o preparo, eram regenerados, antes do uso, por aquecimento em banho de água fervente, por 1 min para cada 1 ml de meio contido no tubo. Após a fervura os tubos eram imersos num banho de gelo para resfriamento rápido e imediatamente semeados.

As incubações das culturas de *C. perfringens* foram feitas a 37°C, em estufa bacteriológica (Fanem), por um período de 18 a 24 h para os meios líquidos e de 48 h para os meios sólidos (jarra de anaerobiose).

## 2.2 Principais meios de cultivo

### 2.2.1 Meios para manutenção de cultura-estoque

Para estoque das culturas foi utilizado o meio de carne cozida, preparado com coração de boi moído e caldo nutriente e distribuído em tubos de rosca. O pH final do meio era ajustado para 7,5 e continha uma solução de sulfato de neomicina a 0,14%, que atua como um agente seletivo, fornecendo as amostras de *C. perfringens*, naturalmente a este antibiótico, nesta concentração.

### 2.2.2 Meios para isolamento e identificação

Foram utilizados os meios de sulfito polimixina sulfadiazina (SPS) e "columbia agar base" (Difco) para o isolamento de amostras de *C. perfringens*. O primeiro meio contém citrato férrico em sua formulação, o que permitia a localização de colônias produtoras de  $H_2S$ , de grande valia na identificação do *C. perfringens*. O segundo meio era preparado segundo as instruções do fabricante e acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro bem como de uma solução de gentamicina a 40  $\mu g/ml$  de meio, utilizado também como agente seletivo.

### 2.2.3 Meios para identificação bioquímica

As amostras identificadas nos meios sólidos, presumivelmente, como sendo *C. perfringens*, eram submetidas a uma bateria de testes bioquímicos para sua identificação definitiva. As provas básicas por nós utilizadas consistiam de: fermentação e digestão do leite (meio de leite em pó a 5%), produção de gelatinase,  $H_2S$  e prova de motilidade ("Trypticase Yeast Glucose Medium" - TYG - Difco), fermentação dos carboidratos: sacarose, lactose e glicose ("Cystine Trypticase Agar" - BBL), avaliação de exigência respiratória (TYG acrescido de ágar, hemina e vitamina K), produção de urease (caldo simples acrescido de 2% de uréia) e produção de lecitinase ("Columbia Agar Base" acrescido de gema de ovo).

#### 2.2.4 Meios para uso geral

Foram utilizados rotineiramente em nosso trabalho os meios de tioglicolato ("Fluid Thyoglicollate Medium", Difco) e de BHI ("Brain Heart Infusion", Difco), ambos preparados de acordo com as instruções do fabricante.

### 3 Teste de microhemaglutinação (MHA)

Diluições seriadas das suspensões de *C. perfringens*, após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos ou dos sobrenadantes destas culturas em PBS 0,05 M, pH 7,4, foram homogeneizadas em placas de microtítulo com uma quantidade equivalente de suspensão de hemácias a 2%. As placas de microtítulo foram deixadas a temperatura ambiente sendo o resultado dos testes lido após a sedimentação dos controles. De rotina, usavam-se 50  $\mu$ l da suspensão bacteriana e 50  $\mu$ l da suspensão de hemácias, sendo estas de diferentes origens. Como controle da reação usava-se a suspensão de hemácias sem adição de bactérias (COLLEE, 1961).

Os experimentos também foram realizados mantendo-se as placas de microtítulo a 4°C.

### **3.1 Preparo da suspensão de hemácias**

As hemácias utilizadas nas provas de MHA foram coletadas em solução anti-coagulante de Alsever (LIMA, SOARES, GRECO, GALIZZI & CANÇADO, 1977) e armazenadas em geladeira. As hemácias de cobaia e de galinha eram coletadas e usadas no mesmo dia. Para uso, as hemácias eram lavadas três vezes em PBS 0,05 M, pH 7,4, centrifugando-as a 2500 rpm, por 5 min e por fim, ressuspensas e padronizadas a 2%, no mesmo tampão. Hemácias de várias origens foram utilizadas: coelho (COE), cobaia (COB), carneiro (CAR), galinha (GAL), boi, cavalo (CAV) e humana (HUM).

### **3.2 Preparo da suspensão de bactérias**

Para obtenção das suspensões bacterianas de *C. perfringens* foram utilizadas culturas de 18 a 24 h, em BHI. A cultura era centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante era coletado em um frasco de penicilina estéril para posterior utilização no teste de MHA e o sedimento ressuspenso em PBS 0,05 M, pH 7,4, numa concentração equivalente à escala 10 de Mac Farland (BIER, 1980).

## **4 Teste de aderência em células HeLa**

Para o ensaio de aderência em células HeLa foram utilizados tubos de Leighton contendo uma monocamada celular

semi-confluente. Após 24 h de incubação das células, o meio de cultivo (Eagle, Interlab) era desprezado e substituído por 1,0 ml do mesmo meio, só que agora contendo 2% de soro fetal bovino (SFB). As amostras bacterianas foram cultivadas em BHI por 18 h, a 37°C e um inóculo de 0,1 ml de cada cultura foi inoculado em um tubo de Leighton e incubado a 37°C por 30 min. As lamínulas foram, então, lavadas 6 vezes em tampão PBS-T (NaCl - 8g, KCl - 0,2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1,15g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2g e água destilada 1000 ml), fixadas com metanol (Carlo Erba) por 20 min e coradas (SCALETISKY, SILVA & TRABULSI, 1984).

#### **4.1 Coloração e montagem das lamínulas**

As lamínulas contendo as células já fixadas foram coradas, primeiramente, durante 5 min com uma solução de May-Grünwald a 2% em metanol p.a. (Geel), diluído a 1:2 em solução de Sorensen (LIMA et alii, 1977) e em seguida, coradas durante 10 min, pelo Giemsa (Reagen) diluído a 1:10 no mesmo tampão. Por fim as lamínulas foram lavadas várias vezes com PBS-T, secas em estufa, tratadas com xilol (Merck) e montadas sobre bálsamo do Canadá (Reagen).

#### **4.2 Determinação do índice de adesão**

Para determinarmos o índice de adesão, as lamínulas foram observadas ao microscópio óptico, escolhendo-se aleatoriamente os campos, tomando-se o cuidado de contar tanto



células do centro como da periferia da lamínula. Foram contadas 100 células por lamínula e a quantidade de bactérias aderidas por célula. O resultado do teste foi calculado como a média de bactérias aderidas nas 100 células contadas. Todos os experimentos de aderência foram realizados em duplicatas e calculado o erro padrão da média dos resultados obtidos (BISHOP, 1966).

## 5 Testes de inibição da aderência em células HeLa

### 5.1 Inibição com o sobrenadante das culturas em BHI

Para o teste de inibição da aderência com o sobrenadante, uma cultura de *C. perfringens* de 24 h, em BHI, foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi guardado em um frasco estéril e usado no teste da seguinte maneira: 0,3 ml do sobrenadante foram colocados sobre a monocamada de células HeLa no tubo de Leighton e incubados a 37°C, por 30 min, sem agitação. Após este período, o meio de cultivo das células contendo o sobrenadante foi desprezado, acrescentando-se, em seguida, 1,0 ml de meio de Eagle novo, contendo 2% de SFB e 0,1 ml da cultura total de *C. perfringens*, em BHI. O tubo de Leighton foi novamente incubado a 37°C, por 30 min e o teste realizado como descrito no item 4.

## 5.2 Inibição com o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio

### 5.2.1 Obtenção de precipitado a partir do sobrenadante da amostra S32 de *C. perfringens* em BHI

A partir de uma pré-cultura da amostra S32 de *C. perfringens* em BHI, incubada por 8 h, a 37°C, repicou-se a amostra para outros quatro tubos de BHI, incubados por 18 h, a 37°C. O conteúdo destes tubos foi transferido para um balão contendo 3 litros de BHI estéril, sendo esta nova cultura incubada em estufa a 37°C, por 24 h. Após este período, a cultura foi centrifugada em caçapas plásticas, em alíquotas de 200 ml, a 10000 rpm, por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes assim obtidos foram transferidos para frascos de vidro estéreis e congelados a -18°C.

No momento do uso, o sobrenadante assim obtido foi descongelado e precipitado com concentrações crescentes de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (Merck), de modo a obter-se precipitados com 20, 45, 60 e 80% de saturação do sal. As alíquotas obtidas após cada precipitação foram dialisadas contra tampão PBS 0,05 M, pH 7,4, sob agitação, a 4°C, até reação negativa com reativo de Nessler. Em seguida, os dialisados foram transferidos para frascos de vidro estéreis e identificados. Antes de serem congelados a -18°C, os dialisados foram dosados quanto ao seu conteúdo proteico, pelo

método de LOWRY modificado (HARTREE, 1972) e seu conteúdo polissacarídico, pelo método de DUBOIS (DUBOIS, GILLIES, HAMILTON, REBERS & SMITH, 1956), sendo, então, reservados para uso posterior em testes de inibição da aderência em células HeLa. Os precipitados assim obtidos foram testados de maneira idêntica à descrita no item 5.1.

### 5.3 Inibição com antissoro

Para o teste de inibição da aderência em células HeLa, com o antissoro preparado contra a bactéria total (item 6), reagimos 0,5 ml de uma suspensão bacteriana, de concentração equivalente a escala 10 de Mac Farland com 0,5 ml de soro anti-amostra S32 de *C. perfringens*, por 30 min, a 37°C. Após este período, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 min e o sobrenadante, desprezado. As bactérias sedimentadas foram ressuspensas em PBS 0,05 M, pH 7,4 para o volume original e 0,1 ml desta suspensão, colocado em um tubo de Leighton contendo 1,0 ml de meio de Eagle acrescido de 2% de SFB, tendo sido o teste realizado conforme descrito no item 4.

### 5.4 Contagem dos testes de inibição

Para cada teste de inibição foi preparado um teste-controle de aderência com a mesma amostra, no mesmo dia e nas mesmas condições. Em cada teste contavam-se 100 células,

registrando-se o número de bactérias aderidas por célula e calculando-se a média correspondente ao número de bactérias aderidas por célula. Calculava-se, então, o índice de inibição ocorrido em relação ao controle. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e calculado o erro padrão da média dos resultados obtidos (BISHOP, 1966).

## **6. Preparo de antissoro anti-Clostridium perfringens (bactéria total)**

### **6.1 Preparo da suspensão bacteriana para imunização de coelhos**

Foram escolhidas duas amostras de *C. perfringens* (64 e S32) para o preparo das suspensões bacterianas a serem usadas na imunização de coelhos, para obtenção de soros anti-bactéria total. O preparo da suspensão foi realizado segundo BATTY & WALKER, 1963 e seguiu o seguinte esquema: para cada amostra foi semeado um tubo contendo meio de carne cozida e incubado por 8 h, a 37°C. Um inóculo de cada uma destas culturas foi repicado para tubos contendo caldo glicosado a 1% e incubados por 16 h, a 37°C.

Após este período, as culturas em caldo glicosado foram centrifugadas a 2000 rpm, por 10 min, a 4°C e os sedimentos obtidos foram submetidos à coloração de Gram (BIER, 1980), para verificar a pureza das amostras e a presença

exclusiva de células vegetativas. A partir destes sedimentos foram obtidas as suspensões bacterianas de duas maneiras:

a) Bactérias mortas pelo calor:

Os sedimentos bacterianos obtidos foram acrescidos de solução salina 0,15 M estéril e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, a 4°C. Após várias lavagens, as amostras foram ressuspensas em salina e homogeneizadas vigorosamente em um agitador Mixtrom (Leucotron Equipamentos S/A), de forma a produzir suspensões bastante homogêneas. Após a homogeneização, as suspensões foram diluídas em salina de acordo com a escala 3 de Mac Farland e levadas a fervura por 30 min;

b) Bactérias mortas pelo formol:

Os sedimentos bacterianos, obtidos conforme descrito anteriormente, foram ressuspensos em solução salina contendo 0,5% de formol e deixados a 4°C por 24 h.

Os antígenos preparados a partir das amostras 64 e S32 foram submetidos a teste de esterilidade antes do uso. As preparações antigênicas foram semeadas em duplicatas nos meios de BHI (Difco), tioglicolato (Difco) e ágar-sangue (BIER, 1980). Os tubos de BHI e tioglicolato foram incubados a 37°C por 24 h e as placas de ágar-sangue foram incubadas em jarra de anaerobiose, a 37°C, por 48 h. Todos os tubos se

apresentaram negativos para crescimento bacteriano após 8 dias de observação.

## **6.2 Esquema de imunização**

O esquema de imunização utilizado foi o descrito por BATTY & WALKER, 1963 e consiste no seguinte: suspensões das bactérias mortas pelo calor ou tratadas com formaldeído foram injetadas intravenosamente em coelhos Nova Zelândia, do sexo feminino, com 4 meses de idade, em intervalos de 3 dias, em doses de 0,5, 1,0, 1,5 ml e 5 doses de 2,0 ml. Após 7 dias da última dose, procedeu-se a sangria de prova dos animais imunizados e tendo-se detectado títulos adequados de anticorpos através de técnica de aglutinação em lâmina, realizou-se a sangria dos animais.

## **6.4 Titulação de anticorpos por testes de aglutinação**

Os anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados foram dosados tanto por teste de aglutinação semi-quantitativo em lâmina, reagindo-se quantidades crescentes de soro com uma quantidade fixa de suspensão antigênica padronizada, como também através de teste de aglutinação quantitativo em tubo, utilizando-se diluições seriadas do antissoro que reagiram com um volume fixo do antígeno padronizado, acrescentado em cada tubo de reação (BIER, 1980).

## **7 Teste de hidrofobicidade**

### **7.1 Preparo dos reagentes e da suspensão bacteriana**

Este teste foi realizado segundo as descrições de HONDA, KHAN, TAKEDA & MIWATAMI, 1983 e DILLON, FUERST, HAYWARD & DAVIS, 1986. Inicialmente, foi preparada uma solução-estoque de fosfato de sódio (Reagen) 0,2 M, pH 6,8 (ajuste feito com solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%) e para uso nas reações, foi diluída 100 vezes em água destilada. Em paralelo, foi preparada uma solução-estoque de sulfato de amônio (Merck) 4M, a partir da qual foram preparadas diluições em tampão fosfato 0,002 M, pH 6,8, partindo-se de 4,0 M até 0,5 M, variando-se de 0,05 M em 0,05 M e de 0,5 M até 0,05 M, variando-se de 0,05M em 0,05 M.

As suspensões bacterianas a serem utilizadas neste teste foram cultivadas em BHI (37°C, 24 h) e após este período, centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos bacterianos ressuspensos em tampão fosfato 0,002 M, pH 6,8 para uma concentração de  $5 \times 10^8$  bactérias/ml.

### **7.2 O teste**

Para a realização do teste de hidrofobicidade foram utilizadas placas de cultura de tecido de fundo chato onde, em cada orifício, foram colocados 25  $\mu\text{l}$  da suspensão bacteriana e

25  $\mu$ l de cada diluição de sulfato de amônio. A placa era, então, agitada por 2 min, a temperatura ambiente e a leitura da reação realizada com o auxílio de uma lupa.

A reação era considerada positiva quando a maioria das bactérias se encontravam agregadas, apresentando uma solução clara contendo agregados brancos, com um diâmetro aproximado de 1/10 mm. A reação era considerada negativa quando pouco ou nenhum agregado era formado, apresentando-se a solução de fundo, opalescente.

Controles: todas as leituras eram comparadas com a reação obtida na mais alta molaridade do sal (4 M), sendo este, o controle positivo. Suspensões bacterianas misturadas com tampão fosfato 0,002 M, pH 6,8, sem qualquer adição do sal eram usadas como controle negativo. Foram consideradas como amostras hidrofóbicas, aquelas que apresentaram reação positiva nas mais baixas concentrações de sulfato de amônio (1,0 M ou menos).

## **8 Teste da alça intestinal ligada em leitões**

### **8.1 Obtenção das culturas bacterianas**

Duas amostras de *C. perfringens* (S32 e VPI-115) foram cultivadas em meio de BHI, por 18 h, a 37°C.



A cultura de cada amostra foi dividida em duas alíquotas. Uma delas foi reservada como cultura total e a outra centrifugada a 3000 rpm, por 15 min e ressuspensa em um volume equivalente de BHI estéril. A concentração bacteriana foi calculada por comparação com a escala de Mac Farland, obtendo-se  $10^4$  a  $10^7$  bactérias/ml. Foram injetados 0,5 ml destas suspensões nas alças intestinais dos leitões, com o auxílio de uma seringa estéril.

## 8.2 O teste

Para as provas de aderência "in vivo", foram utilizados leitões da raça Landrace, do sexo feminino, pesando 1 kg, recém-nascidos por cesariana, e classificados como animais livres de germes patogênicos (SPF), apresentando população de bactérias da flora intestinal normal praticamente nula, conforme exames histológicos realizados como controle. Estes animais foram privados de mamar o colostro e não ingeriram sequer água até o momento da cirurgia (4 horas após o nascimento).

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados intramuscularmente com uma associação de Stressnil (Rhodia) e Rohypnol (Roche), na concentração de 15-20  $\mu$ g/kg de peso, com relação a cada um destes medicamentos. Após antisepsia do campo cirúrgico com álcool iodado a 5%, foi feita uma incisão de aproximadamente 8 cm na linha mediana da parede abdominal,

tendo como ponto médio a cicatriz umbilical. O intestino delgado foi exposto e não precisou receber nenhum tipo de lavagem.

Após a exposição do intestino, partindo-se de uma distância de 10 cm do estômago, no sentido próximo-distal, foram feitas alças ligadas de aproximadamente 5 cm cada uma, sempre intercaladas por uma alça menor de 2 cm (interalça). Em seguida, cada alça foi inoculada com 0,5 ml da suspensão bacteriana a ser examinada.

Após a inoculação, os intestinos foram recolocados na cavidade abdominal, procedendo-se a sutura do peritônio, camada muscular e pele. Em cada animal foram feitas 10 alças, incluindo-se os controles: salina 0,15 M estéril e meio de BHI estéril. Após 1 e 3 h da cirurgia, os animais foram eletrocutados com uma corrente elétrica de 220 V, procedendo-se, em seguida, à abertura da cavidade abdominal. O intestino delgado era retirado, as alças identificadas e examinadas quanto ao acúmulo de líquido, sendo o material prontamente fixado para as preparações histológicas.

### **8.3 Fixação do material para inclusão em parafina**

Cada alça intestinal, obtida como descrito acima, foi estendida sobre uma placa de Petri e o segmento central, cortado com uma lâmina de aço afiada (fragmentos de 1 cm) e

imerso em formalina tamponada (YAMAGISHI et alii, 1987), onde permanecia por 24 h.

Após a fixação, o material foi incluído em parafina e processado para cortes histológicos de 5 a 6  $\mu$ m de espessura, tendo sido esta etapa realizada no Departamento de Histologia e Embriologia, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, sob a orientação do Prof. Dr. ÁUREO TATSUMI YAMADA. Os cortes foram corados com hematoxilina/eosina e examinados em microscópio óptico, em aumento de 40 e 100 vezes. Alguns cortes foram separados e submetidos à coloração de Gram para demonstração de bactérias em cortes de tecido, pela técnica de BROWN E BRENN (MOWRY & MCMANUS, 1964) e também examinadas por microscopia óptica.

#### 9 Tratamento enzimático da amostra S32 de C. perfringens

Foi realizado um teste de aderência em células HeLa, utilizando a amostra S32 de **C. perfringens** tratada com três concentrações diferentes das enzimas tripsina e protease.

As enzimas foram diluídas utilizando-se 0,05 M de HEPES (ácido N-2 hidroxitril piperazine - N' - 2' - etanosulfônico) como estabilizante dos respectivos diluentes das enzimas. No quadro V constam a procedência das enzimas, as concentrações utilizadas e os respectivos diluentes acrescidos

do sal acima mencionado, tendo sido o pH final das soluções acertado com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M (BARTUS, ACTOR, SNIPES, SEDLOCK & ZAJAK, 1985).

Nos experimentos enzimáticos, as culturas bacterianas foram inicialmente centrifugadas e padronizadas no tampão correspondente da reação (quadro V). Foram colocados, então, em tubos de vidro, 1 ml da suspensão de bactérias padronizadas e 1 ml das diferentes concentrações das enzimas em análise. Em cada experimento, reservava-se um tubo para controle da reação, com as bactérias ressuspensas apenas no diluente das enzimas.

As bactérias permaneciam em contato com as enzimas por 1 hora, a 37°C, sendo, após, centrifugadas e lavadas em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4. Depois de lavadas, as bactérias eram ressuspensas no mesmo tampão e submetidas a teste de aderência em células HeLa, conforme descrito no item 4.

Quadro V - Reagentes e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios enzimáticos

| Reagente | Origem | Diluyente                                          | pH  | concentrações analisadas<br>(mg/ml) |
|----------|--------|----------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|
| TRIPSINA | Sigma  | 0,9% NaCl + 1mM CaCl <sub>2</sub>                  | 7,6 | 0,25; 2,0; 10,0                     |
| PROTEASE | Sigma  | PBS + 1 mM Ca <sup>++</sup> + 1mM Mg <sup>++</sup> | 7,0 | 0,0125; 0,025; 0,25                 |

# 10 Tratamento da amostra S32 de C. perfringens com metaperiodato de sódio

## 10.1 Preparo dos reagentes e da suspensão bacteriana

Inicialmente, foi preparada uma solução de acetato de sódio (Merck) 0,1 M. Como esta solução é alcalina, foi adicionado ácido acético glacial, gota a gota, até a solução atingir o pH 4,4, antes de se completar o volume final de preparo.

Foi, também, preparada uma solução de metaperiodato de sódio (Sigma) 20 mM. Para isto, o sal foi primeiramente dissolvido em água destilada, sendo, em seguida, feita adição

de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,4, que permitiu a completa solubilização do sal.

Para obtenção da suspensão bacteriana, a amostra S32 de *C. perfringens* foi semeada em meio de BHI e incubada a 37°C, por 24 h. Após este período, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min, o sobrenadante desprezado e o sedimento bacteriano ressuspenso em PBS 0,05 M, pH 7,4, para uma concentração correspondente a escala 10 de Mac Farland.

#### 10.2 O teste

Partes iguais da suspensão bacteriana, obtida conforme descrito acima e da solução de metaperiodato de sódio 20 mM foram misturadas em tubo de ensaio e mantidas em banho-maria a 37°C, por 30 min. Após este período, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 min, o sobrenadante desprezado e o sedimento bacteriano ressuspenso em tampão PBS 0,05 M, pH 7,4, para o volume original usado na reação. Esta suspensão bacteriana foi usada no teste de aderência a células HeLa, usando-se, como controle da reação, uma suspensão da amostra S32 de *C. perfringens* que não recebeu nenhum tratamento.

## **11 Obtenção de extratos ácidos da amostra S32 de C. perfringens**

### **11.1 Extrato obtido com ácido acético 0,03 N**

A amostra S32 de **C. perfringens** foi cultivada em meio de BHI, por 24 h, a 37°C. Após este período, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 min. O sedimento bacteriano obtido foi lavado duas vezes em solução salina 0,15 M e, em seguida, ressuspenso em ácido acético 0,03 N e colocado em tubo de ensaio para fervura durante 45 min (PESTANA DE CASTRO, comunicação pessoal).

Após esta etapa, a suspensão foi novamente centrifugada a 2000 rpm, durante 20 min, separando-se o sobrenadante (extrato bacteriano). O pH ácido do extrato foi, então, neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, a fim de se obter pH 7,0 (testado em papel indicador Merck). Depois de acondicionado em frasco com tampa de borracha, o extrato foi congelado a -18°C e reservado para uso em teste de inibição de aderência em células HeLa e imunodifusão em gel (Ouchterlony) (ROESEL, 1981).

### **11.2 Extrato obtido com ácido clorídrico 0,2 N**

A amostra S32 de **C. perfringens** foi cultivada em meio de BHI, por 24 h, a 37°C. Após este período, a cultura

foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 min. O sedimento obtido foi suspenso em PBS contendo HCl 0,2 N e mantido em estufa a 37°C, por 2 h, com agitações periódicas. Após este período, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante obtido (extrato bacteriano) foi neutralizado com NaOH 0,1 N (BIER, 1980). O extrato foi acondicionado em frasco de vidro e congelado a -18°C para uso em teste de inibição de aderência em células HeLa e imunodifusão em gel (ROESEL, 1981).

## **12 Microscopia eletrônica**

Esta etapa de nosso trabalho foi desenvolvida no Centro de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biologia, sob orientação da Profª Drª MARIA ALICE DA CRUZ HOLFLING.

### **12.1 Técnica de contrastação negativa com ácido fosfotúngstico**

Esta técnica consistia em contactar uma suspensão bacteriana (cultura total de *C. perfringens* em BHI) com uma tela de cobre previamente coberta com parlódio e uma fina camada de carbono, por um período de 2 a 5 min. Em seguida, a suspensão bacteriana excedente, que não aderiu à tela, foi removida com o auxílio de um papel de filtro e sobre ela foram colocados 10 µl de uma solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1% (Reagen). Após 2 min de contato, o excesso do ácido foi retirado com papel de filtro e a tela colocada numa placa de



Petri, coberta com papel absorvente. Após secagem da tela a temperatura ambiente, esta era observada ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 9S-2, operado em 60 KV, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

## **12.2 Técnica de inclusão em resina Epon**

### **12.2.1 Preparo das bactérias**

Para uso nesta técnica foram cultivadas quatro amostras de *C. perfringens* (S32, 208, VPI-115, JAB-1) em BHI, por 24 h, a 37°C. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 min e em seguida, lavadas três vezes em PBS 0,02 M, pH 7,4, por centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sedimento bacteriano foi tratado ou não com soro anti-amostra S32 de *C. perfringens* antes do processo de fixação.

### **12.2.2 Estabilização de estruturas de superfície com antissoro**

O tratamento das células bacterianas com antissoro produzido contra a bactéria total, morta pelo calor, foi realizado segundo MACKIE, BROWN, LAM & COSTERTON, 1979 e consistia, resumidamente, no seguinte: 0,15 ml de soro anti-amostra S32 de *C. perfringens*, não diluído, foram aplicados ao

sedimento obtido conforme descrito no item anterior, por um período de 1 hora, a 37°C, com agitação frequente. As células bacterianas foram, então, centrifugadas, lavadas com PBS e submetidas ao tratamento de pré-fixação em glutaraldeído.

### **12.2.3 Pré-fixação em glutaraldeído**

Para as observações posteriores, através desta técnica, nossas amostras foram divididas em dois grupos. Um, que recebeu tratamento com antissoro e outro, controle, que não recebeu esse tipo de tratamento. Ambos os grupos foram pré-fixados por 30 min em 5 ml de glutaraldeído (Merck) a 5% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,4 (preparado a partir do ácido cacodílico, Sigma), tendo sido cada grupo dividido em dois sub-grupos, sendo que, um deles, teve acrescido na solução de glutaraldeído, 0,15% do corante vermelho de rutênio (Sigma) (LUFT, 1971). Após este período, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e encapsuladas em ágar a 4% (Difco) (JACQUES & FOIRY, 1987).

### **12.2.4 Encapsulamento das bactérias em ágar 4%**

Para o encapsulamento das bactérias em ágar, foi preparada uma solução aquosa de ágar a 4%, que foi fundida no momento de uso e mantida em banho-maria a 45°C. Os tubos de centrífuga contendo os sedimentos bacterianos tratados e não-tratados com antissoro também foram mantidos em banho-maria a

45°C, até estabilização da temperatura. Então, uma pequena gota de ágar a 4% foi transferida para o tubo de centrifuga com o auxílio de uma pipeta pré-aquecida e este foi agitado gentilmente para suspender as células no ágar.

Os tubos de centrifuga, após receberem o ágar, tiveram seu conteúdo imediatamente vertido sobre uma lâmina de vidro gelada, de tal forma que o ágar se solidificasse imediatamente após o contato com a lâmina fria. Após a solidificação do ágar, as pequenas placas achatadas formadas eram cortadas com uma lâmina afiada em cubículos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>.

Após este tratamento, as células encapsuladas de cada um dos subgrupos foram submetidas ao processo de fixação, novamente ressaltando-se que dois deles receberam vermelho de rutênio na solução fixadora (JACQUES & FOIRY, 1987).

#### **12.2.5 Fixação das bactérias em glutaraldeído**

Os pequenos cubos de ágar, contendo as bactérias, foram fixados em glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,4, durante uma noite. Os subgrupos tratados com vermelho de rutênio receberam 0,05% deste corante na solução acima e foram fixados da mesma maneira. No dia seguinte, os blocos de ágar receberam a fixação pelo tetróxido de ósmio.

#### **12.2.6 Fixação pelo tetróxido de ósmio a 1%**

As amostras incubadas por 18 h com glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato contendo ou não vermelho de rutênio foram lavadas 5 vezes em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,4, por 10 min cada lavagem, sendo que os subgrupos tratados com vermelho de rutênio tiveram 0,05% desse corante acrescido no tampão.

Após as lavagens, as amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,4, contendo 0,05% de vermelho de rutênio, onde necessário, por 4 h. Após este período, as amostras foram lavadas 5 vezes em tampão cacodilato, por 10 min em cada lavagem e contendo também vermelho de rutênio nos subgrupos que receberam este tratamento. Terminadas as lavagens, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação.

#### **12.2.7 Desidratação e inclusão**

As amostras foram desidratadas em acetona (Ecibra) graduada (30, 50, 70, 90 e 100%), sendo que em cada gradação as amostras permaneceram 30 min e foram submetidas a duas passagens em acetona pura. Os subgrupos tratados com vermelho de rutênio foram desidratados da mesma forma, com a ressalva de que as soluções de acetona 30, 50 e 70% receberam cada uma 0,05% de vermelho de rutênio.

Após as passagens em acetona pura, esta foi desprezada e as amostras embebidas em uma mistura de Epon - acetona 1 : 1, V/V, onde permaneceram, a temperatura ambiente, por 18 h, em frasco aberto inclinado. Em seguida, processou-se à inclusão do material em resina Epon-812, utilizando-se a forma média descrita por LUFT, 1961, que consistia em juntar-se partes iguais das misturas A e B e quantidade suficiente de acelerador DMP-30 (2,4,6 tridimetilamina-metil fenol) para obtenção de blocos de média dureza. Os blocos permaneceram em estufa a 60°C até a completa polimerização do Epon.

#### **12.2.8 Obtenção de cortes semi-finos**

Os cortes semi-finos, de aproximadamente 0,5  $\mu$ m de espessura, foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter-blum, MT-2B, com utilização de navalhas de vidro.

Estes cortes foram coletados em lâminas de vidro e depois de secos e aderidos nas referidas lâminas, processou-se à sua coloração, gotejando-se sobre os mesmos solução de azul de toluidina a 5%, em bórax. Depois de corados, os cortes foram lavados rápida e delicadamente em água corrente para remoção do excesso de corante. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e examinadas em microscópio óptico Zeiss, com objetiva de imersão, para seleção dos blocos contendo o material desejado para observação ao microscópio eletrônico.

#### 12.2.9 Obtenção de cortes ultra-finos

Cortes ultra-finos de aproximadamente 30-50 nm de espessura, apresentando coloração que variava do cinza ao levemente dourado, segundo a escala de cores de interferência proposta por PEACHEY, 1958, foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter-blum, MT-2B, com utilização de navalhas de vidro.

Estes cortes foram colhidos em telas de cobre e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 2%, por 30 min, a temperatura ambiente (WATSON, 1958). Depois de rápida lavagem em água bidestilada e secagem, os cortes foram colocados na superfície de uma gota de citrato de chumbo a 2% em solução 1 N de hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965, modificado) por 2 min, a temperatura ambiente e dentro de placa de Petri selada, onde grande parte do dióxido de carbono é absorvido por pastilhas de hidróxido de sódio. Depois de rápida e cuidadosa lavagem em água bidestilada, as telas foram secas ao ar.

### III RESULTADOS

#### 1 Teste de hemaglutinação em placas de microtítulo (MHA)

Vários testes de hemaglutinação foram desenvolvidos em nosso trabalho, sendo que, inicialmente, procuramos padronizar as melhores condições para a realização dos mesmos bem como desenvolver estudos sobre os fatores que influenciavam este tipo de reação.

##### 1.1 Influência do meio de cultivo

###### 1.1.1 Cultivo em meio sólido

Algumas amostras de *C. perfringens*, escolhidas aleatoriamente, foram cultivadas em diferentes meios de cultura sólidos, suspensas em PBS 0,05 M, pH 7,4 segundo a escala 10 de Mac Farland e, em seguida, examinadas quanto a sua capacidade hemaglutinante frente a hemácias de carneiro (CAR), coelho (COE) e cobaia (COB). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1 e expressos como a recíproca da mais alta diluição da suspensão bacteriana que apresentou reação positiva.

Tabela 1. Influência do cultivo em meios sólidos, sobre a capacidade hemaglutinante, a temperatura ambiente, de algumas amostras de *C. perfringens* frente a diferentes hemácias.

| AMOSTRAS | MEIOS DE CULTIVO |     |                   |    | HEMÁCIAS |     |     |
|----------|------------------|-----|-------------------|----|----------|-----|-----|
|          | SPS              | CAB | BHI <sub>16</sub> | AS | CAR      | COB | COE |
| II       | X                |     |                   |    | -        | -   | 2*  |
|          |                  | X   |                   |    | -        | -   | 8   |
|          |                  |     | X                 |    | -        | 8   | 32  |
|          |                  |     |                   | X  | -        | -   | 4   |
| III      | X                |     |                   |    | -        | -   | 2   |
|          |                  | X   |                   |    | -        | 2   | 4   |
|          |                  |     | X                 |    | -        | 8   | 16  |
|          |                  |     |                   | X  | -        | -   | 4   |
| VIII     | X                |     |                   |    | -        | -   | -   |
|          |                  | X   |                   |    | 4        | 2   | 8   |
|          |                  |     | X                 |    | 8        | 8   | 16  |
|          |                  |     |                   | X  | -        | -   | 2   |
| 201      | X                |     |                   |    | -        | -   | -   |
|          |                  | X   |                   |    | -        | 2   | -   |
|          |                  |     | X                 |    | 8        | 4   | 8   |
|          |                  |     |                   | X  | 8        | -   | 2   |

SPS: sulfito polimixina sulfadiazina

CAB: "columbia agar base"

BHI: "brain heart infusion"

AS: agar sangue

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Como pode ser observado na Tabela 1, os melhores e mais frequentes títulos hemaglutinantes foram obtidos com as bactérias cultivadas em meio de BHI sólido e "Columbia Agar Base". O meio SPS foi o menos expressivo, no que diz respeito a reações positivas de microhemaglutinação (MHA), frente às hemácias examinadas.



### 1.1.2 Cultivo em meio líquido

As mesmas amostras examinadas quanto a capacidade hemaglutinante, após cultivo em meio sólido, foram também estudadas após cultivo em meio líquido, frente aos mesmos tipos de hemácias. As reações foram realizadas a temperatura ambiente, com a cultura total da bactéria e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Influência do cultivo em meios líquidos, sobre a capacidade hemaglutinante, a temperatura ambiente, de algumas amostras de *C. perfringens* frente a diferentes hemácias.

| AMOSTRAS | MEIOS DE CULTIVO |                 |     | HEMÁCIAS |     |     |
|----------|------------------|-----------------|-----|----------|-----|-----|
|          | TIO              | BM <sub>1</sub> | BHI | CAR      | COB | COE |
| II       | X                | X               | X   | -        | -   | 2*  |
| III      | X                | X               | X   | -        | 4   | 128 |
| VIII     | X                | X               | X   | -        | -   | 2   |
| 201      | X                | X               | X   | -        | 2   | 64  |
|          |                  |                 |     | -        | 8   | 64  |
|          | X                | X               | X   | 2        | 2   | 16  |
|          |                  |                 |     | -        | -   | 16  |
|          |                  |                 |     | 8        | 8   | 256 |
|          | X                | X               | X   | 2        | 2   | 2   |
|          |                  |                 |     | -        | 2   | -   |
|          |                  |                 |     | 8        | 8   | 8   |

TIO: "fluid thyoglicollate medium"

BM<sub>1</sub>: meio de DUNCAN & STRONG modificado por UEMURA para esporulação de *C. perfringens* (UEMURA, 1979)

BHI: "brain heart infusion"

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Podemos observar na Tabela 2 que, para as amostras examinadas, o meio de BHI líquido foi o que melhor favoreceu a capacidade hemaglutinante das bactérias. O meio BM<sub>1</sub>, que estimula a esporulação do *C. perfringens* e o meio de tioglicolato não foram tão satisfatórios quanto o de BHI, neste tipo de reação.

Devido a facilidades práticas e baseados nos resultados acima, padronizamos, para uso posterior, somente o meio de BHI líquido para cultivo do *C. perfringens* a ser usado nas reações de MHA.

### 1.2 Influência da concentração bacteriana

Para este estudo, algumas amostras de *C. perfringens* foram semeadas em meio líquido (BHI) e sólido ("Columbia Agar Base") e procedemos a reação a aglutinação frente a hemácias de coelho. Os sedimentos obtidos a partir do cultivo em meio de BHI foram utilizados puros (papa de bactérias) ou diluídos em PBS 0,05 M, pH 7,4. As amostras cultivadas em meio sólido foram utilizadas, nas reações, na forma de raspado de colônias, suspensão em PBS 0,05 M, pH 7,4 segundo a escala 10 de Mac Farland e diluições desta suspensão, no mesmo tampão. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3 e expressos como a recíproca da mais alta diluição da suspensão

bacteriana que apresentou reação positiva.

Tabela 3. Influência da concentração bacteriana nos títulos hemaglutinantes da reação de MHA frente a hemácias de coelho, a temperatura ambiente, após cultivo em meios sólido e líquido.

| AMOSTRAS | MEIO LÍQUIDO (BHI) |           |           |           |           |           | MEIO SÓLIDO (CAB)     |                          |           |           |           |
|----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|
|          | PURO               | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | RASPADO<br>DE COLÔNIA | ESCALA 10<br>MAC FARLAND | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ |
| II       | 256*               | 8         | -         | -         | -         | -         | 8                     | -                        | -         | -         | -         |
| VI       | 128                | 8         | 2         | -         | -         | -         | 1024                  | 128                      | 16        | 4         | -         |
| A        | 64                 | 2         | -         | -         | -         | -         | 128                   | 64                       | -         | -         | -         |
| 64       | 1024               | 16        | 2         | -         | -         | -         | 1024                  | 128                      | 8         | 2         | -         |
| 97       | 1024               | 8         | -         | -         | -         | -         | 256                   | 64                       | 16        | -         | -         |
| 532      | 256                | 8         | -         | -         | -         | -         | 1024                  | 256                      | 16        | 8         | 2         |

BHI: "brain heart infusion"

CAB: "columbia agar base"

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Como pode ser observado através dos resultados acima, pelo menos com relação às hemácias de coelho, usadas inicialmente, a concentração bacteriana é um fator importante a ser considerado nas reações de MHA pois, títulos altos de hemaglutinação somente foram obtidos quando se partiu de uma suspensão bacteriana densa. Assim, em reações realizadas

posteriormente, foi padronizado o uso de suspensão bacteriana na escala 10 de Mac Farland.

### **1.3 Influência do pH**

Para o estudo da influência do pH na reação de MHA, utilizamos o tampão PBS 0,05 M em cinco diferentes pHs, compreendidos numa faixa que abrangia desde o pH 5,6 até o pH 8,0. Os resultados obtidos com o sedimento e o sobrenadante de algumas amostras de *C. perfringens*, demonstraram que o pH do tampão diluente não influenciava significativamente os títulos da reação de MHA. Em pH 8,0, houve uma queda geral dos títulos para todas as amostras examinadas, com exceção da amostra 97, que para todos os valores de pH apresentou um título hemaglutinante constante. Em pH 5,6 não foi observado qualquer padrão de aglutinação, não tendo sido observada sedimentação nem no controle da reação (hemácias + tampão). Para uso nas reações de MHA realizadas posteriormente, foi padronizado o uso do tampão PBS 0,05 M, em pH 7,4.

### **1.4 Influência da temperatura de reação**

Realizamos as reações de MHA em três temperaturas diferentes com a intenção de verificarmos se haviam diferenças no padrão hemaglutinante. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Influência da temperatura da reação de MHA, frente a diferentes hemácias, após cultivo de algumas amostras de *C. perfringens* em meio de BHI.

| HEMÁCIAS | GALINHA |      |      | CARNEIRO |      |      | COELHO |      |      |
|----------|---------|------|------|----------|------|------|--------|------|------|
| AMOSTRAS | 4°C     | T.A. | 37°C | 4°C      | T.A. | 37°C | 4°C    | T.A. | 37°C |
| III      | -       | 16*  | -    | -        | -    | -    | -      | 256  | 128  |
| II       | -       | -    | -    | -        | -    | -    | 16     | 512  | 128  |
| VIII     | 2       | 8    | 8    | -        | Lise | Lise | 64     | 2048 | 64   |
| 64       | -       | -    | -    | -        | 2    | 2    | 16     | 128  | 128  |
| S32      | -       | -    | -    | -        | 4    | -    | -      | 64   | 4    |

T.A.: temperatura ambiente

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Baseados nos resultados obtidos com as reações frente às hemácias de coelho, podemos concluir que os títulos aglutinantes mais altos se expressam a temperatura ambiente. Entretanto, a incubação das placas de microtítulo a 4°C ou a 37°C não inibem completamente a reação, embora haja casos em que isto aconteça, como os verificados com as amostras III e S32 incubadas a 4°C com hemácias de coelho.

### 1.5 Influência da temperatura de cultivo das amostras bacterianas

Foram repetidas algumas reações de MHA, a temperatura ambiente, cultivando-se a bactéria em duas diferentes temperaturas (37 e 18°C), a fim de verificarmos se o cultivo a temperaturas mais baixas, à semelhança do verificado em *E. coli* (JONES, 1977) inibia a expressão de alguma estrutura de superfície produzida pelo *C. perfringens* a 37°C. As reações foram realizadas frente a hemácias de coelho, carneiro e galinha, tendo sido as bactérias cultivadas em meio de BHI. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Influência da temperatura de cultivo das amostras de *C. perfringens* sobre os títulos das reações de MHA, realizadas a temperatura ambiente, frente a diferentes hemácias.

| HEMÁCIAS | GALINHA |      | CARNEIRO |      | COELHO |      |
|----------|---------|------|----------|------|--------|------|
| AMOSTRAS | 18°C    | 37°C | 18°C     | 37°C | 18°C   | 37°C |
| VI       | 8*      | 32   | -        | -    | lise   | 64   |
| III      | 4       | 16   | -        | -    | 4      | 256  |
| II       | -       | -    | -        | -    | 32     | 16   |
| 97       | 16      | 32   | 2        | 8    | 32     | 512  |
| 64       | -       | -    | -        | 2    | 64     | 128  |
| S32      | -       | -    | 2        | 4    | 16     | 64   |

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Como podemos observar, o cultivo das amostras de *C. perfringens* a 18°C não aboliu a capacidade hemaglutinante das bactérias, embora tenha reduzido o título em alguns casos, como observado principalmente com hemácias de coelho e de galinha.

As reações da Tabela 5 foram, também, realizadas a temperatura de 4°C e pudemos observar um padrão semelhante de aglutinação das bactérias cultivadas a 37°C e uma diminuição um pouco mais acentuada no título hemaglutinante das bactérias cultivadas a 18°C (resultados não apresentados).

#### **1.6 Influência da presença de D-manose no tampão de reação**

Como a presença de D-manose no tampão de reação é amplamente empregada nos estudos de bactérias fimbriadas, tais como a *Escherichia coli*, com a finalidade de inibir reações hemaglutinantes devidas a fímbria do tipo 1, que possuem este carboidrato em seus receptores (JONES, 1977), resolvemos, no nosso trabalho, estudar o efeito deste açúcar em nossas reações de MHA frente a diferentes hemácias, realizando as reações a temperatura ambiente (Tabela 6).

Tabela 6 - Influência da presença de D-manose no tampão da reação de MHA de diversas amostras de *C. perfringens*, frente a diferentes hemácias, a temperatura ambiente.

| HEMÁCIAS | COE  |     | COB |     | CAR |    | CAV |    | GAL |    | BOI |    |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|
| AMOSTRAS | -M   | +M  | -M  | +M  | -M  | +M | -M  | +M | -M  | +M | -M  | +M |
| VIII     | 256* | 256 | 8   | 8   | 8   | 8  | 16  | 4  | 4   | 8  | 8   | 8  |
| 04       | 4    | 2   | 4   | -   | -   | -  | 4   | -  | -   | -  | 2   | -  |
| 53       | 128  | 64  | 8   | 4   | 4   | 4  | 4   | 2  | 4   | 4  | 8   | 4  |
| 55       | 32   | 128 | 64  | 16  | 8   | 4  | 32  | 16 | 4   | 4  | 8   | 32 |
| 64       | 32   | 64  | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
| 81       | 32   | 64  | 32  | 16  | 2   | 2  | 8   | 8  | 8   | 8  | 4   | 2  |
| 97       | 64   | 64  | 2   | 2   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
| 143      | 8    | 32  | 4   | 8   | 2   | 4  | 4   | 2  | -   | -  | 2   | -  |
| 201      | 4    | 4   | 8   | 4   | 8   | 4  | 4   | 2  | 2   | 2  | 8   | 8  |
| 208      | 32   | 64  | 128 | 128 | 32  | 32 | 64  | 32 | 16  | 32 | 64  | 32 |

-M: tampão PBS sem manose

+M: tampão PBS contendo 0,5% de manose

\*: Recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Como pode ser observado na Tabela 6, a presença de D-manose no tampão não pareceu influenciar a reação de MHA, das amostras examinadas, nas condições do teste.



### 1.7 Triagem das amostras de *C. perfringens* através da técnica de MHA.

Baseados nos dados coletados junto aos testes apresentados até aqui, submetemos todas as nossas amostras de *C. perfringens* a uma triagem frente a diversos tipos de hemácias, para estudar o padrão hemaglutinante destas amostras, com a finalidade de tentar agrupá-las por esta característica.

Para isto, padronizamos nosso teste utilizando amostras de *C. perfringens* cultivadas em BHI, a 37°C, por um período de 18 a 24 hs. Essas culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o teste realizado tanto com o sobrenadante da cultura como com o sedimento ressuspenso em PBS 0,05 M, pH 7,4 padronizado para a escala 10 de Mac Farland. As reações foram feitas a temperatura ambiente, aguardando-se um tempo de 2 horas para a leitura dos resultados.

A apresentação dos resultados encontra-se na Tabela 7, onde as amostras de *C. perfringens* apresentam-se agrupadas conforme já descrito em Material e Métodos.

Tabela 7 - Estudo comparativo de diversas amostras de *C. perfringens*, frente a diferentes tipos de hemácias, em reação de MHA, utilizando-se tanto a suspensão bacteriana como o sobrenadante das culturas.

| GRUPO | HEMÁCIAS |     | COE |     | GAL |     | COB |     | HUM |     | CAR |     | CAV |     | BOI  |    |
|-------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|
|       | AMOSTRAS | BCT | SOB | BCT | SOB | BCT | SOB | BCT | SOB | BCT | SOB | BCT | SOB | BCT | SOB* |    |
|       |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
| II    | A        | 8   | 64  | 16  | -   | -   | L   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | B        | 32  | 16  | 16  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | C        | L   | L   | 16  | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -   | 8   | -   | 8   | -    | -  |
|       | D        | 64  | -   | 32  | 16  | L   | -   | -   | -   | 8   | -   | 8   | -   | 8   | -    | -  |
|       | I        | 32  | 16  | 32  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | II       | 32  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | III      | 128 | 16  | 16  | 16  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 8   | -   | -   | -    | -  |
|       | VI       | 256 | 64  | 16  | 8   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | VIII     | 256 | 256 | 8   | -   | 8   | -   | -   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 04       | -   | -   | 16  | -   | -   | -   | L   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 55       | 64  | 32  | -   | -   | 16  | L   | 8   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 64       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 97       | 32  | 16  | 128 | 128 | 8   | -   | 16  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 16   | 32 |
|       | 143      | -   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 201      | 8   | -   | L   | L   | 8   | -   | -   | -   | 8   | -   | 8   | -   | -   | -    | -  |
|       | 208      | -   | -   | 8   | -   | 8   | -   | -   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 218      | 64  | -   | 16  | -   | 8   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 223      | L   | L   | -   | -   | L   | L   | L   | -   | -   | -   | L   | L   | -   | -    | -  |
|       | 246      | -   | 16  | 16  | 16  | 16  | -   | 8   | -   | 8   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 280      | 16  | -   | L   | L   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 16  | -   | -   | -    | -  |
|       | 291      | -   | -   | L   | L   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
| III   | CMC-25   | -   | -   | -   | -   | 2   | 2   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | CMC-26   | -   | -   | -   | -   | 2   | 2   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | CMC-31   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | VPI-87   | 2   | 2   | 2   | -   | 2   | 8   | -   | 2   | 2   | -   | 2   | 2   | 4   | -    | -  |
|       | VPI-115  | -   | -   | -   | -   | 4   | 4   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | VPI-207  | -   | -   | 2   | 2   | 64  | 64  | -   | 4   | 4   | -   | -   | -   | 2   | 2    | -  |
|       | 239-F    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | 398-F    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | KZ-303   | 2   | -   | -   | -   | 2   | 2   | -   | 2   | 2   | -   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | KZ-304   | 8   | 8   | 4   | 4   | 64  | 64  | -   | 32  | 32  | 4   | 8   | 4   | 8   | -    | -  |
| I     | 532      | 64  | 256 | -   | -   | 4   | -   | -   | 4   | -   | 2   | -   | -   | -   | -    | -  |
|       | JAB-1    | 8   | -   | -   | 4   | 4   | 4   | -   | 8   | 32  | -   | -   | -   | -   | 4    | -  |
|       | JAB-2    | 4   | -   | -   | 4   | 2   | 8   | -   | 4   | 32  | -   | 2   | -   | -   | 4    | -  |

BCT: suspensão bacteriana; SOB: sobrenadante da cultura; L: hemólise

\*: recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Após a realização deste estudo comparativo, podemos observar que não há um padrão constante de hemaglutinação neste tipo de teste entre as amostras estudadas. As amostras do grupo "II" aglutinaram melhor as hemácias de coelho e galinha, apesar de algumas amostras isoladas terem aglutinado também hemácias de cobaia. Estas hemácias foram, por sua vez, as melhores aglutinadas pelas amostras de grupo "III" e dentro do grupo "I" houve uma distribuição do padrão hemaglutinante entre as hemácias de coelho, cobaia e carneiro. Os sobrenadantes das amostras examinadas também apresentaram reação de hemaglutinação positiva, tendo sido observados títulos mais altos entre as amostras do grupo II, principalmente frente a hemácias de coelho e galinha. Este resultado fala a favor da presença de substância solúvel presente nas amostras de *C. perfringens*.

#### **1.8 Influência do tratamento térmico sobre a reação de MHA**

A fim de conhecermos a reação de algumas amostras do *C. perfringens* frente ao calor, submetemos culturas desta bactéria, cultivadas em BHI, a um aquecimento a 60°C, por um período de 10 min, com agitação constante. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 min e os sedimentos obtidos ressuspensos em PBS 0,05 M, pH 7,4 para a escala 10 de Mac Farland e submetidos a reação de MHA frente a

diversas hemácias. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Influência do tratamento térmico de amostras de *C. perfringens* sobre o título aglutinante na reação de MHA, realizada a temperatura ambiente, frente a diferentes hemácias.

| AMOSTRAS | HEMÁCIAS: COE |     | COB |     | CAR |     | GAL |     |
|----------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          | -TT           | +TT | -TT | +TT | -TT | +TT | -TT | +TT |
| II       | 32*           | 32  | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| VI       | 256           | 64  | -   | -   | -   | -   | 16  | 8   |
| 97       | 32            | 256 | 8   | 16  | -   | -   | 128 | 16  |
| VPI-115  | -             | -   | 4   | 4   | -   | -   | -   | -   |
| S32      | 64            | 64  | 4   | 2   | 4   | 4   | -   | -   |

-TT: sem tratamento térmico

+TT: com tratamento térmico

\*: recíproca da mais alta diluição que apresentou resultado positivo

Os resultados do teste mostraram que, de forma geral, o tratamento térmico realizado pouco influenciou os títulos hemaglutinantes na reação de MHA. A amostra 97 apresentou um aumento no título aglutinante frente às hemácias de coelho após o tratamento térmico, podendo isto significar uma exposição de estruturas de superfície responsáveis pela aglutinação das hemácias, após o aquecimento.

### **1.9 Influência da presença de hemina no cultivo de amostras de C. perfringens submetidas a reação de MHA**

Para este estudo, foram cultivadas algumas amostras de **C. perfringens** em meio de BHI, na ausência ou presença (5, 10, 25 µg/ml) de hemina, com o intuito de favorecer um ambiente de anaerobiose (MCKEE et alii, 1986). As amostras assim cultivadas foram submetidas a reação de MHA frente a hemácias de carneiro, galinha e cobaia. Os resultados obtidos com as amostras S32, 208, JAB-1 e VPI-115 não demonstraram qualquer influência da hemina em relação aos títulos obtidos na ausência desta substância (dados não apresentados).

### **2 Testes de aderência em células HeLa**

Para o estudo de aderência de amostras de **C. perfringens** foram utilizadas células HeLa como modelo experimental, em decorrência de sua ampla utilização neste tipo de estudo com outras bactérias (SCALETISKY et alii, 1984). Assim, procedemos, inicialmente, a uma padronização das melhores condições para o desenvolvimento do teste, utilizando controles com aderência já bem definida para que tornássemos o teste confiável e reprodutível, na avaliação de nossas amostras.

Assim, estabelecemos em 30 min o tempo para a realização do teste de aderência e utilizamos quantidades

variáveis de inóculos bacterianos, buscando verificar com qual delas obteríamos os melhores resultados. Após experimentos com diversas amostras, concluímos que variando-se de 0,1 a 0,5 ml a quantidade de suspensão bacteriana (cultura total) inoculada sobre as células HeLa, poucas alterações eram observadas no padrão de aderência das bactérias. Os inóculos maiores apenas dificultavam tecnicamente o teste por permitirem que um número maior de bactérias ficassem aderidas, inespecificamente, às lamínulas. Devido a isto, testes posteriores foram padronizados para 0,1 ml de inóculo.

Para tornar nossos experimentos de aderência reprodutíveis introduzimos alguns controles que foram repetidos a cada nova realização do teste. A interpretação destes controles será descrita a seguir e, como foram sempre repetitivos, sua descrição será omitida na apresentação dos resultados subsequentes.

A- controle positivo: utilizamos como padrão positivo de aderência uma amostra de *Escherichia coli* apresentando aderência difusa em células HeLa (SCALETSKY et alii, 1984), empregando-se um inóculo de 0,1 ml de sua cultura total, em meio de BHI. A amostra, nas condições do teste, apresentou-se aderente, conforme o padrão conhecido, demonstrando que tecnicamente o teste estava sendo corretamente realizado.

B- controle das células: utilizamos dois tubos de Leighton, sem adição de cultura bacteriana, manipulados de acordo com a sequência geral da técnica, a fim de verificarmos se o processo de lavagem e manipulação das lamínulas, para coloração, não provocava injúrias ou descolamento do tapete celular. O resultado final observado foi que, após todo o processamento das células, estas encontravam-se, em sua maioria, intactas e corando-se adequadamente.

C- controle do meio de BHI: a fim de verificarmos se o meio empregado para o cultivo das bactérias não seria, por si só, danoso às células HeLa, realizamos um teste utilizando ao invés de inóculo bacteriano, quantidades de 0,1, 0,25 e 0,5 ml de BHI estéril, nas mesmas condições que os demais tubos do teste. O resultado final demonstrou que o BHI não exercia qualquer efeito lesivo sobre as células HeLa, sendo viável utilizar culturas totais de *C. perfringens* na realização dos testes.

## 2.2 Triagem de algumas amostras de *C. perfringens*

Baseados nos resultados obtidos durante a padronização do teste, resolvemos examinar algumas amostras de *C. perfringens*, no teste de aderência em células HeLa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9, discriminando-se os grupos a que pertencem as amostras escolhidas.

Segundo estes dados, a amostra S32 de *C. perfringens* mostrou-se altamente aderente neste modelo celular, aderindo paralelamente ao longo da membrana citoplasmática das células HeLa, como pode ser observado nas fotografias da Prancha I. As amostras VIII, 64, 208 e CWC-26 foram consideradas pouco aderentes e a maioria das outras amostras, não aderentes.

Tabela 9 - Estudo comparativo de algumas amostras de *C. perfringens* em teste de aderência a células HeLa.

| ===== |          |                               |
|-------|----------|-------------------------------|
| GRUPO | AMOSTRAS | Nº BACTÉRIAS POR CÉLULA ± EPM |
| ===== |          |                               |
|       | S32      | 30,02 ± 1,16 (4)*             |
| I     | JAB-1    | 0,50 ± 0,32 (3)               |
|       | JAB-2    | 0,12 ± 0,02 (3)               |
|       | -----    |                               |
|       | VIII     | 2,32 ± 0,23 (3)               |
|       | 208      | 1,77 ± 0,03 (2)               |
| II    | 97       | 0,07 ± 0,01 (3)               |
|       | 64       | 2,60 ± 0,25 (4)               |
|       | 291      | 0,15 ± 0,02 (3)               |
|       | -----    |                               |
|       | CWC-25   | 0,86 ± 0,03 (3)               |
|       | CWC-26   | 1,90 ± 0,06 (2)               |
|       | CWC-31   | 0,70 ± 0,07 (2)               |
|       | VPI-87   | 1,00 ± 0,10 (2)               |
| III   | VPI-115  | 0,70 ± 0,10 (3)               |
|       | VPI-207  | 0,73 ± 0,25 (3)               |
|       | KZ-303   | 0,09 ± 0,01 (3)               |
|       | KZ-304   | 0,70 ± 0,32 (3)               |
| ===== |          |                               |

EPM: erro padrão da média

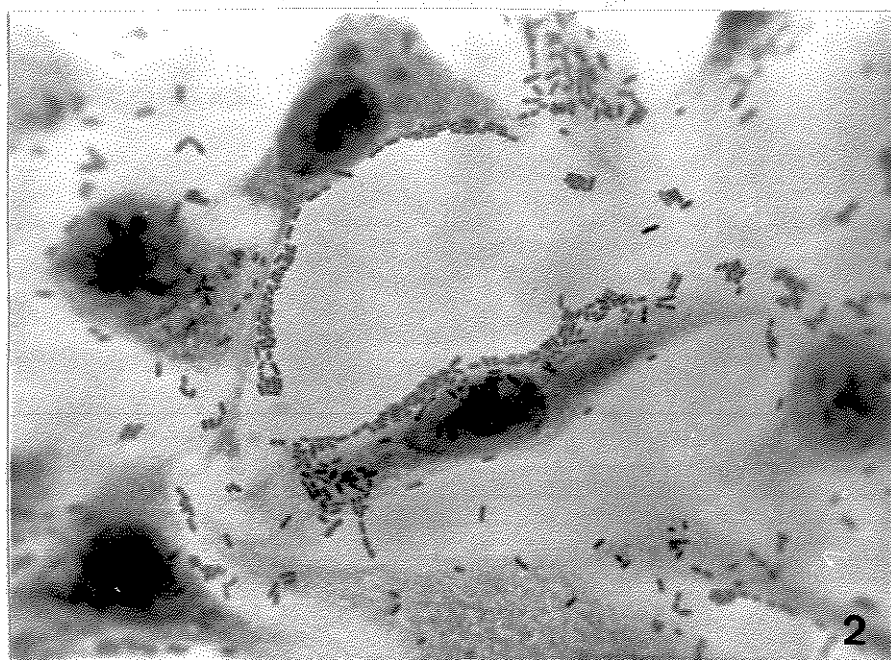
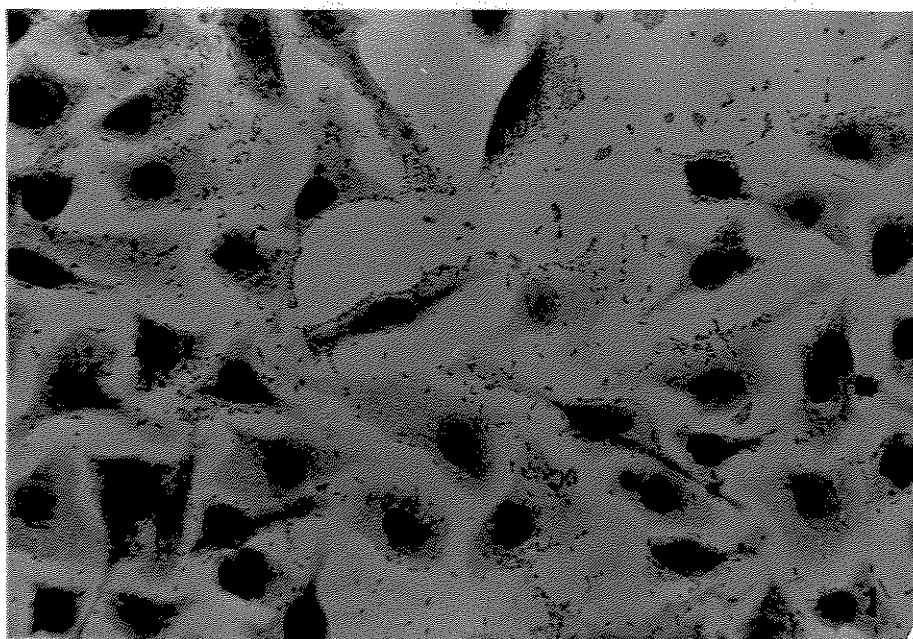
\*: número de experimentos realizados



## PRANCHA I

Figura 1 - Amostra S32 de *C. perfringens* aderida a células HeLa. Aumento 400 x.

Figura 2 - Amostra S32 de *C. perfringens* aderida a células HeLa. Observar disposição paralela das bactérias em relação a membrana da célula HeLa. Aumento 1000 x.



### 2.3 Influência das condições de cultivo

Algumas amostras de *C. perfringens* foram examinadas no teste de aderência a células HeLa após cultivo em diferentes meios, a fim de verificarmos se a condição de crescimento da bactéria favoreceria o aparecimento de estruturas de superfície na célula bacteriana. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Influência das condições de cultivo sobre a aderência de duas amostras de *C. perfringens* às células HeLa.

| =====                                |                 |                               |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| AMOSTRA                              | MEIO DE CULTURA | Nº BACTÉRIAS POR CÉLULA ± EPM |
| =====                                |                 |                               |
|                                      | BHI líquido     | 22,22 ± 4,64 (4)**            |
| S32                                  | BHI sólido      | 17,83 ± 2,57 (4)              |
|                                      | Columbia        | 3,07 ± 0,18 (2)               |
|                                      | -----           |                               |
|                                      | BHI líquido     | 1,77 ± 0,12 (4)               |
| 208                                  | BHI sólido      | 0,85 ± 0,13 (2)               |
|                                      | Columbia        | 0,70 ± 0,23 (2)               |
| =====                                |                 |                               |
| EPM: erro padrão da média            |                 |                               |
| *: número de experimentos realizados |                 |                               |

Para a amostra S32, o meio de cultivo pareceu influenciar o padrão de aderência. O cultivo em meio de BHI, líquido ou sólido, conferia à bactéria a capacidade de se ligar em grande número às células HeLa. Para a amostra 208,

nenhuma variação nos meios de cultivo pesquisados, favoreceu o aparecimento de estruturas adesivas.

#### **2.4 Influência da hemina**

Com o intuito de verificarmos se a hemina presente no meio de cultivo do *C. perfringens* favoreceria o aparecimento de estruturas responsáveis pela sua adesão às células HeLa, procedemos a um teste de aderência utilizando amostras de *C. perfringens* cultivadas em ausência (controle) e presença de hemina (5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$ ).

Os resultados obtidos com as amostras examinadas, em presença de hemina, demonstraram que esta substância não favoreceu a aderência das bactérias a este modelo celular, encontrando-se, nos testes realizados, valores de aderência semelhantes aqueles obtidos com os controles (dados não apresentados).

#### **2.5 Influência do tratamento enzimático**

Com o objetivo de estudarmos a natureza química da estrutura de superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, responsável por sua aderência às células HeLa, tratamos esta amostra com duas enzimas proteolíticas diferentes e, em seguida, a submetemos ao teste de aderência, cujo resultado é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Influência do tratamento enzimático sobre a aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa.

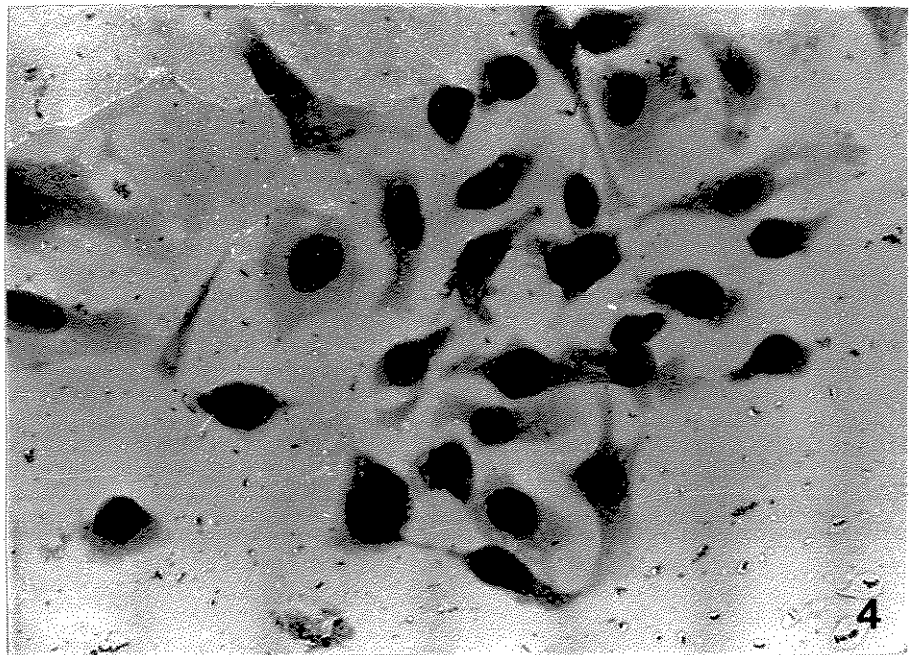
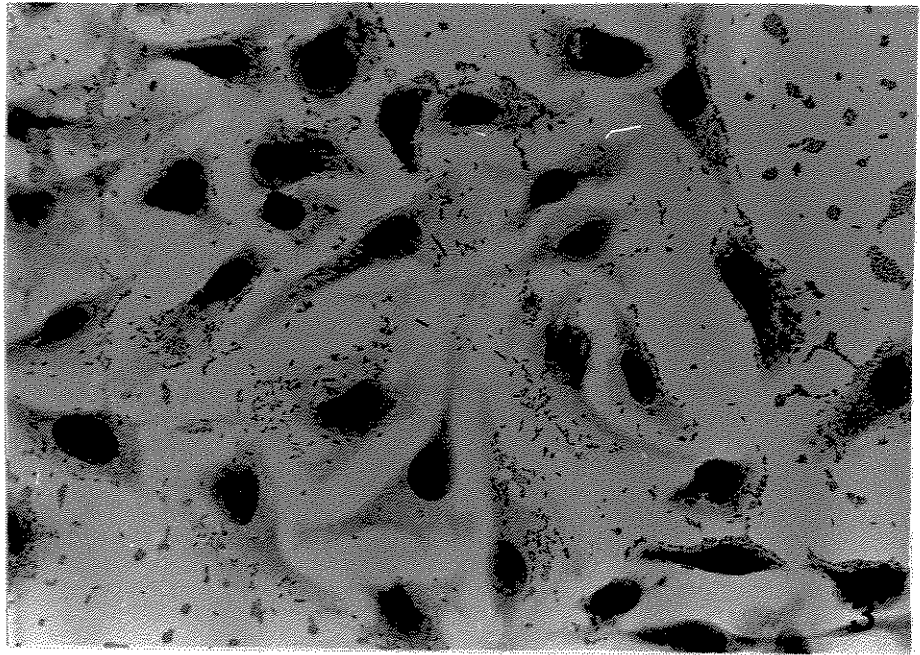
| =====                                |                         |                                  |
|--------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| ENZIMA                               | CONCENTRAÇÃO<br>(mg/ml) | Nº BACTÉRIAS POR<br>CÉLULA ± EPM |
| =====                                |                         |                                  |
|                                      | AUSENTE                 | 10,86 ± 0,63 (2)*                |
| TRIPSINA                             | 0,25                    | 2,32 ± 0,88 (2)                  |
|                                      | 2,00                    | 2,78 ± 0,42 (2)                  |
|                                      | 10,00                   | N.D.                             |
| -----                                |                         |                                  |
|                                      | AUSENTE                 | 49,15 ± 1,26 (5)                 |
| PROTEASE                             | 0,0125                  | 46,90 ± 0,72 (2)                 |
|                                      | 0,025                   | 52,96 ± 0,16 (2)                 |
|                                      | 0,25                    | N.D.                             |
| =====                                |                         |                                  |
| N.D.: não determinado                |                         |                                  |
| EPM: erro padrão da média            |                         |                                  |
| *: número de experimentos realizados |                         |                                  |

O tratamento com tripsina levou a amostra S32 de *C. perfringens* a apresentar um índice menor de aderência em relação aquele observado em ausência de tratamento enzimático. Este comportamento indica a presença de estruturas de natureza proteica envolvidas direta ou indiretamente na adesão desta amostra às células HeLa. O tratamento com protease apresentou algumas dificuldades, uma vez que esta enzima, quando usada

## PRANCHA II

Figura 3 - Amostra S32 de *C. perfringens* aderida às células HeLa sem ter recebido qualquer tratamento. Aumento 40 x.

Figura 4 - Amostra S32 de *C. perfringens* aderida às células HeLa após ter recebido tratamento com periodato. Observar a acentuada redução no número de bactérias aderidas por célula. Aumento 40 x.



nas mesmas concentrações que a tripsina, destruía a monocamada de células HeLa, inutilizando o experimento. Assim, tivemos que utilizar concentrações menores de protease, não tendo sido observado qualquer efeito desta enzima sobre a aderência da amostra S32 de *C. perfringens*, às células HeLa.

## 2.6 Influência do tratamento com metaperiodato de sódio

Com o intuito de pesquisarmos a presença de estruturas de natureza polissacarídica sobre a superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, envolvidas no mecanismo de adesão, tratamos esta amostra com um agente oxidante de carboidratos e a submetemos, em seguida, a um teste de aderência em célula HeLa. Na Tabela 12 apresentamos os resultados obtidos.

Tabela 12 - Influência do tratamento com metaperiodato de sódio sobre a aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa.

| CONCENTRAÇÃO DE<br>METAPERIODATO<br>DE SÓDIO (mg/ml) | Nº DE BACTÉRIAS POR<br>CÉLULA $\pm$ EPM |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| -                                                    | 49,15 $\pm$ 1,26 (5)*                   |
| 10,0                                                 | 5,03 $\pm$ 0,10 (2)                     |
| 5,0                                                  | 6,48 $\pm$ 0,07 (2)                     |
| 2,5                                                  | 9,53 $\pm$ 0,31 (2)                     |

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados



Neste teste, ilustrado na Prancha II, pudemos observar uma nítida diminuição do índice de adesão após o tratamento com periodato, indicando a presença de estruturas de natureza polissacarídica, envolvidas na aderência da amostra S32 de *C. perfringens*, às células HeLa. É possível, também, notar um efeito dose - resposta em relação às diferentes concentrações de metaperiodato utilizadas.

## 2.7 Influência do tratamento térmico

Para este experimento, submetemos uma cultura da amostra S32 de *C. perfringens* a diversos tratamentos térmicos, procedendo, em seguida, a um teste de aderência às células HeLa. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos.

Tabela 13 - Influência do tratamento térmico da amostra S32 de *C. perfringens* sobre a aderência às células HeLa.

| =====                                |                               |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| TRATAMENTO TÉRMICO                   | Nº BACTÉRIAS POR CÉLULA ± EPM |
| =====                                |                               |
| -                                    | 11,96 ± 0,69 (5)*             |
| 100°C - 5 min                        | 1,50 ± 0,06 (2)               |
| 56°C - 10 min                        | 4,92 ± 1,47 (3)               |
| =====                                |                               |
| EPM: erro padrão da média            |                               |
| *: número de experimentos realizados |                               |

O experimento acima demonstra que um tratamento térmico vigoroso é capaz de desnaturar a estrutura de superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, responsável pela sua aderência, às células HeLa.

### 3 Testes de inibição da aderência em células HeLa

#### 3.1 Inibição pelo uso do sobrenadante

Baseados em nossas reações de MHA, cujos resultados obtidos com os sobrenadantes das culturas de *C. perfringens* em BHI indicavam a presença de uma substância solúvel, capaz de aglutinar diversos tipos de eritrócitos, resolvemos pesquisar se esta substância seria parte da estrutura adesiva de superfície, presente na amostra S32 de *C. perfringens*. Assim, após tratarmos as células HeLa com o sobrenadante de sua cultura em meio de BHI, procedemos a um teste de aderência, obtendo os resultados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Teste de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa através do uso de sobrenadante de sua cultura em BHI.

| CONCENTRAÇÃO DO<br>SOBRENADANTE | Nº BACTÉRIAS POR<br>CÉLULA $\pm$ EPM |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| -                               | 17,67 $\pm$ 3,34 (3)*                |
| PURO                            | 9,31 $\pm$ 1,08 (3)                  |
| 1/2                             | 10,02 $\pm$ 0,17 (2)                 |
| 1/10                            | 7,58 $\pm$ 1,06 (2)                  |

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados

O uso do sobrenadante da amostra S32, como inibidor de sua aderência às células HeLa, mostrou-se positivo quando utilizado puro ou diluído 1/2 e 1/10, apresentando um padrão de cerca de 50% de inibição para qualquer diluição nesta faixa. Diluições crescentes do sobrenadante não se mostraram lineares em relação a porcentagem de inibição que causaram (dados não apresentados).

### 3.1.1 Inibição pelo sobrenadante tratado pelo calor

Com o objetivo de verificarmos se o tratamento térmico destruiria a substância inibidora da aderência da amostra S32 de *C. perfringens*, tratamos seu sobrenadante pelo calor e o utilizamos como inibidor da aderência no teste feito em células HeLa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Teste de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* através do uso de seu sobrenadante tratado pelo calor.

| SOBRENADANTE | TRATAMENTO<br>TÉRMICO | Nº BACTÉRIAS POR<br>CÉLULA $\pm$ EPM |
|--------------|-----------------------|--------------------------------------|
| —            |                       | 12,11 $\pm$ 0,66 (4)*                |
|              | —                     | 7,24 $\pm$ 1,06 (3)                  |
|              | 56°C - 30 min         | 7,00 $\pm$ 1,00 (2)                  |
| PURO         | 56°C - 60 min         | 10,93 $\pm$ 1,18 (2)                 |
|              | 100°C - 5 min         | 13,80 $\pm$ 1,20 (2)                 |
|              | 100°C - 30 min        | 11,71 $\pm$ 0,25 (2)                 |

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados

O experimento demonstrou que os tratamentos térmicos empregados, foram capazes de inativar a aderência da amostra S32 de *C. perfringens*.

### 3.1.2 Inibição pelo sobrenadante precipitado por sulfato de amônio.

Com o intuito de concentrar uma possível estrutura de natureza proteica presente no sobrenadante da cultura da amostra S32 de *C. perfringens*, tratamos este sobrenadante com diferentes concentrações de sulfato de amônio empregando, em seguida, os concentrados obtidos como inibidores da aderência desta amostra, às células HeLa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Teste de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* através do uso de seu sobrenadante concentrado pelo sulfato de amônio.

| SOBRENADANTE                         |  | FAIXA DE PRECIPITAÇÃO<br>COM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Nº BACTÉRIAS<br>POR CÉLULA<br>± EPM |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| ---                                  |  | ---                                                       | 12,41 ± 1,85 (2)*                   |
| PURO                                 |  | ---                                                       | 4,11 ± 0,56 (3)                     |
|                                      |  | 0 - 20 %                                                  | 6,00 ± 0,27 (2)                     |
| PRECIPITADO                          |  | 20 - 45 %                                                 | 8,06 ± 1,26 (2)                     |
|                                      |  | 45 - 60 %                                                 | 8,08 ± 0,84 (2)                     |
|                                      |  | 60 - 80 %                                                 | 12,30 ± 0,71 (2)                    |
| EPM: erro padrão da média            |  |                                                           |                                     |
| *: número de experimentos realizados |  |                                                           |                                     |

Como pode ser observado, as faixas de concentração de 0-20, 20-45 e 45-60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentaram os melhores índices de inibição da aderência às células HeLa. Assim, preparamos uma mistura dessas três alíquotas e verificamos a concentração de proteínas e polissacarídeos não só na mistura, como também na fração de 60 - 80%. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Dosagem de proteínas e polissacarídeos nas frações obtidas por precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio.

| SOBRENADANTE<br>PRECIPITADO<br>(% SATURAÇÃO) | CONTEUDO PROTEICO<br>(mg/ml) | CONTEUDO POLISSACARÍDICO<br>(mg/ml) |
|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 0 - 60                                       | 0,25                         | 0,037                               |
| 60 - 80                                      | N.D.                         | 0,136                               |

N.D.: não determinado por floculação do material proteico presente no material

Pelos resultados obtidos, podemos observar que o tratamento do sobrenadante com sulfato de amônio não concentrou efetivamente substâncias de natureza proteica na faixa onde foi observada uma inibição de aderência mais efetiva. As concentrações proteica e polissacarídica

determinadas, foram, significativamente mais baixas na faixa de 0-60% de saturação em relação a faixa de 60-80%, contrariamente à inibição observada.

### 3.2 Inibição pelo uso de antissoro

#### 3.2.1 Antissoro preparado com bactéria morta pelo calor

Nas provas de inibição, foi utilizado um antissoro preparado em coelho, contra a amostra S32 de *C. perfringens*, cujo título aglutinante em tubo, foi de 1/320. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Teste de inibição de aderência da amostra S32 de *C. perfringens*, através do uso de antissoro preparado em coelho, contra a bactéria morta pelo calor.

| CONCENTRAÇÃO DO ANTISSORO |  | NO BACTÉRIAS / CÉLULA $\pm$ EPM |
|---------------------------|--|---------------------------------|
| —                         |  | 30,11 $\pm$ 1,78 (3)*           |
| PURO                      |  | 6,00 $\pm$ 0,02 (2)             |
| 1/10                      |  | 9,93 $\pm$ 0,56 (2)             |
| 1/40                      |  | 12,35 $\pm$ 1,15 (2)            |
| 1/160                     |  | 9,65 $\pm$ 1,36 (2)             |
| 1/640                     |  | 18,10 $\pm$ 0,93 (2)            |
| 1/1280                    |  | 17,49 $\pm$ 0,90 (2)            |
| 1/2560                    |  | 21,02 $\pm$ 1,12 (2)            |
| 1/5120                    |  | 16,41 $\pm$ 2,94 (2)            |

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados

O teste de inibição da aderência pelo uso de antissoro contra a bactéria total (amostra S32) mostrou-se positivo quando este era usado puro ou diluído até 1/640. Acima desta diluição, os resultados mostraram-se pouco variáveis, indicando que a presença do soro não mais interferia no processo de aderência da bactéria, embora não se tenha uma explicação de porque não se restabeleceu o índice de aderência do controle ( $30,11 \pm 1,78$  BCT/CEL).

### **3.2.2 Antissoro preparado com bactérias mortas pelo formol.**

Realizamos um teste de inibição de aderência da amostra S32 às células HeLa, da mesma maneira como descrito no ítem anterior, variando somente o antissoro, tendo sido este preparado em coelho com a amostra morta pelo formol e apresentando título aglutinante em tubo, igual a 1/320. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Teste de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens*, através do uso de antissoro preparado em coelho, contra a bactéria morta pelo formol.

| =====                     |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| CONCENTRAÇÃO DO ANTÍSSORO | Nº BACTÉRIAS / CÉLULA ± EPM |
| =====                     |                             |
| ---                       | 18,36 ± 5,10 (4)*           |
| PURO                      | 9,19 ± 0,39 (2)             |
| 1/10                      | 11,68 ± 0,54 (2)            |
| 1/40                      | 14,14 ± 0,85 (2)            |
| 1/160                     | 18,64 ± 1,85 (3)            |
| 1/640                     | 16,21 ± 2,89 (3)            |

=====

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados

A utilização do antissoro preparado com a suspensão bacteriana morta pelo formol também apresentou resultados positivos, em teste de inibição da aderência, apesar do controle da reação (sem soro) ter dado um índice menor de aderência. Aqui também podemos notar uma melhor inibição com as concentrações mais elevadas de antissoro e a partir da diluição de 1/160, já observamos uma recuperação da aderência da amostra, sem influência da presença do soro.

Os resultados acima, de conformidade com os anteriormente apresentados, demonstram inibição da aderência pelo uso de antíssoros preparados contra a bactéria total.



### 3.3 Inibição pelo uso de outros soros

Realizamos teste de inibição da aderência da amostra S32 usando antissoro obtido em coelho, contra a amostra 64 de *C. perfringens*, morta tanto pelo calor como pelo formol, bem como um soro não-imune de coelho, procurando verificar se a inibição observada não era um fenômeno inespecífico. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Teste de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* através de antissoros homólogos e heterólogos.

| =====                                |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| SORO                                 | Nº BACTÉRIAS POR CÉLULA $\pm$ EPM |
| =====                                |                                   |
| -                                    | 12,87 $\pm$ 0,52 (3)*             |
| ANTI-S32 (MORTA PELO CALOR)          | 6,00 $\pm$ 0,02 (2)               |
| ANTI-S32 (MORTA PELO FORMOL)         | 9,19 $\pm$ 0,39 (2)               |
| -----                                |                                   |
| ANTI-64 (MORTA PELO CALOR)           | 7,90 $\pm$ 1,34 (2)               |
| ANTI-64 (MORTA PELO FORMOL)          | 7,03 $\pm$ 0,07 (2)               |
| NÃO-IMUNE                            | 2,92 $\pm$ 0,30 (4)               |
| =====                                |                                   |
| EPM: erro padrão da média            |                                   |
| *: número de experimentos realizados |                                   |

O soro heterólogo levou a uma inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa da mesma

forma que o soro homólogo. Além disso, verificamos a ocorrência de um fenômeno inesperado, visto que o soro normal de coelho também promoveu a inibição da aderência em níveis melhores do que aqueles apresentados com soro heterólogo e mesmo homólogo.

### 3.4 Inibição pelo uso de extratos ácidos

Utilizamos tratamentos com ácido acético 0,03 N e ácido clorídrico 0,2 N para extrairmos possíveis estruturas de superfície, presentes na superfície da amostra S32 de *C. perfringens*. Após neutralização com NaOH 0,1 N, os extratos foram utilizados em teste de inibição da aderência às células HeLa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa, através do uso de extratos ácidos desta amostra bacteriana.

| EXTRATO          | DILUIÇÃO | Nº DE BACTÉRIAS/CÉLULA $\pm$ EPM |
|------------------|----------|----------------------------------|
| —                | —        | 49,15 $\pm$ 1,26 (5)*            |
|                  | PURO     | 41,94 $\pm$ 1,70 (2)             |
| ÁCIDO ACÉTICO    | 1/10     | 51,27 $\pm$ 1,27 (2)             |
|                  | 1/100    | 47,89 $\pm$ 1,48 (2)             |
|                  | PURO     | 21,61 $\pm$ 1,66 (2)             |
| ÁCIDO CLORÍDRICO | 1/10     | N.D.                             |
|                  | 1/100    | 44,40 $\pm$ 3,32 (2)             |

N.D.: não determinado

EPM: erro padrão da média

\*: número de experimentos realizados

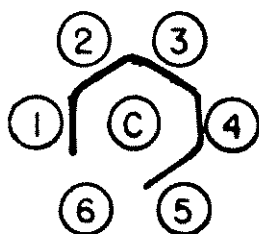
Os resultados apresentados demonstram que o extrato obtido com ácido acético não inibiu a aderência da amostra S32 às células HeLa mas, por outro lado, o extrato puro de ácido clorídrico provocou uma redução de cerca de 50% no índice de aderência desta amostra.

#### 3.4.1 Imunodifusão em gel dos extratos ácidos

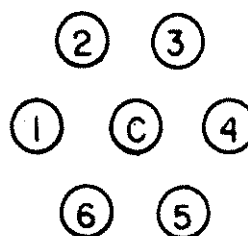
Através da técnica de imunodifusão em gel de ágar (Ouchterlony), buscamos verificar se os dois antissoros preparados em coelho contra a amostra S32 de *C. perfringens*, (por tratamento térmico ou formalina) reconheciam estruturas de superfície extraídas desta amostra, pelos ácidos acético e clorídrico. Como um controle para este experimento, preparamos extratos ácidos da amostra JAB-1 de *C. perfringens*, da mesma maneira como descrito para a amostra S32 e os reagimos contra os antissoros preparados com a amostra S32.

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o antissoro preparado com a amostra S32 morta pelo calor como aquele preparado com a amostra inativada pelo formol reconheceram estruturas extraídas desta mesma amostra, pelo tratamento com ácido clorídrico 0,2 N, enquanto que, nenhuma linha de precipitação foi obtida por reação dos antissoros com o extrato obtido com ácido acético 0,03 N (Ilustração 1, Prancha III).

### PRANCHA III



**Esquema A**



**Esquema B**

Ilustração 1 - Esquema da reação de imunodifusão em gel de ágar (Ouchterlony).

Esquema A: Titulação do extrato obtido por tratamento da amostra S32 de *C. perfringens* com ácido clorídrico, nas diluições 1/1 a 1/8 (base 2) frente ao soro homólogo.

Esquema B: Titulação do extrato obtido por tratamento da amostra S32 de *C. perfringens* com ácido acético, nas diluições 1/1 a 1/8 (base 2) frente ao soro homólogo.

C: soro total anti-amostra S32 de *C. perfringens* produzido com a bactéria morta pelo calor.

Orifícios 1 e 2: extrato puro (1/1).

Conforme esperado, os antissoros anti-S32 não reagiram com os extratos ácidos obtidos da amostra JAB-1 de *C. perfringens*, que é uma amostra não aderente às células HeLa (dados não apresentados).

#### 4 Teste de hidrofobicidade

Com o intuito de verificarmos se a composição de superfície de algumas amostras de *C. perfringens* lhes conferiam caráter hidrofóbico, estas foram examinadas através da técnica do "salting out", efetuando-se o cultivo das mesmas em ausência e presença de hemina (5, 10 e 25 µg/ml). A presença da hemina no meio de cultivo serviu para favorecer um ambiente de anaerobiose, o que poderia facilitar o aparecimento de estruturas de superfície, responsáveis pela sua capacidade adesiva, a exemplo do que acontece com outras espécies bacterianas, como o *Bacteroides gingivalis* (MCKEE et alii, 1986).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 22, onde podemos observar que duas amostras mostraram-se hidrofóbicas (208 e VPI-115), enquanto que as demais aglutinaram somente com 2,0 M ou mais de sulfato de amônio e, conseqüentemente, foram identificadas como não-hidrofóbicas. A presença de hemina no meio de cultivo não favoreceu o aparecimento de estruturas de superfície capazes de conferir caráter hidrofóbico às amostras examinadas.

Tabela 22 - Teste de hidrofobicidade de algumas amostras de *C. perfringens* cultivadas em BHI com ou sem hemina.

|       |         | HIDROFOBICIDADE        |          |          |          |
|-------|---------|------------------------|----------|----------|----------|
|       |         | CONCENTRAÇÃO DE HEMINA |          |          |          |
| GRUPO | AMOSTRA | 0                      | 5 µg/ml  | 10 µg/ml | 25 µg/ml |
| I     | 208     | ≤ 0,10 M*              | ≤ 0,10 M | ≥ 1,50 M | = 0,05 M |
|       | 97      | -                      | N.D.     | = 4,00 M | = 4,00 M |
|       | 64      | -                      | -        | -        | -        |
|       | VIII    | -                      | -        | -        | -        |
| II    | CWC-31  | -                      | = 4,00 M | -        | ≤ 0,15 M |
|       | KZ-304  | -                      | -        | -        | -        |
|       | VPI-115 | -                      | ≤ 0,50 M | -        | -        |
|       | 239-F   | ≥ 3,00 M               | = 4,00 M | ≥ 2,00 M | ≥ 2,50 M |
|       | KZ-303  | -                      | -        | -        | -        |
| III   | S32     | -                      | = 4,00 M | -        | -        |
|       | JAB-1   | = 4,00 M               | ≥ 3,50 M | = 4,00 M | ≥ 3,50 M |
|       | JAB-2   | -                      | -        | -        | -        |

\*: maior concentração de sulfato de amônio onde se verificou a formação de agregados. São consideradas positivas para hidrofobicidade as amostras que aglutinaram com sulfato de amônio em concentração igual ou inferior a 1,0 M

## 5 Teste da alça intestinal ligada em leitões

Com este teste tentamos reproduzir "in vivo" a aderência observada "in vitro" com a amostra S32 de *C. perfringens*. Para isto, além desta amostra, selecionamos também a VPI-115, isolada de um caso de enterite necrotizante em bezerro, sendo, sorologicamente, classificada como tipo C. A amostra S32, isolada de um caso de enterite necrotizante em suíno, no transcorrer de nosso trabalho, foi gentilmente classificada pelo Prof. YAMAGISHI, da Universidade de Toyama, no Japão, como pertencente ao grupo A. Devemos ressaltar aqui, que não é muito comum o isolamento de amostras de *C. perfringens* tipo A de casos de enterite necrotizante em leitões, sendo estes animais, normalmente, vítimas de amostras tipo C, embora exista na literatura, relato de casos desta patologia em leitões recém-nascidos, causada por amostras de *C. perfringens* do tipo A (OLUBUNMI & TAYLOR, 1985).

Assim, descreveremos a seguir, a análise histológica dos cortes de intestino delgado dos leitões após inoculação das amostras e coloração pela hematoxilina-eosina e coloração de Gram, para visualização de bactérias em cortes histológicos.

**5.1 Análise das alças inoculadas com a amostra 632 de C. perfringens no leitão sacrificado após 3 horas da cirurgia.**

**5.1.1 Controle: salina estéril**

A mucosa intestinal mostrava-se pouco alterada, com o epitélio íntegro na maior parte do revestimento. Os vasos linfáticos encontravam-se dilatados, provavelmente em decorrência do ato de amarrar o intestino. A submucosa apresentava dilatação dos vasos em geral. A luz intestinal encontrava-se limpa, sem resíduos de qualquer espécie. Não foram encontrados indícios de bactérias aderidas às vilosidades intestinais, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6 da Prancha IV.

**5.1.2 Controle: BHI estéril**

A mucosa apresentava-se com vilosidades aparentemente não afetadas; alterações de vasos menos acentuadas do que o controle com salina estéril. Vasos linfáticos dilatados e submucosa com vasos também apresentando dilatação. Superfície das vilosidades não apresentando indícios de bactérias aderidas. A descrição acima pode ser observada na Figura 7 da Prancha IV.

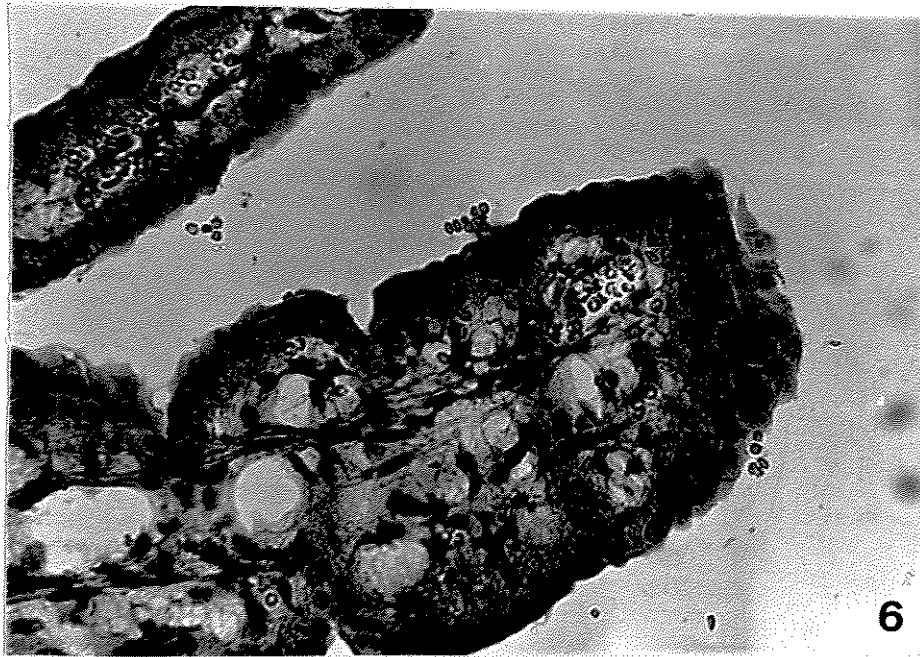


#### PRANCHA IV

Figura 5 - Visão geral do intestino delgado em corte transversal. Inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina. Aumento 100 x.

Figura 6 - Detalhe das vilosidades intestinais intactas após inoculação de solução salina 0,15 M estéril. A luz intestinal encontra-se sem resíduos e não há indícios da presença de bactérias aderidas ao epitélio. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.

Figura 7 - Detalhe das vilosidades intestinais sem alterações morfológicas após a inoculação de meio de BHI estéril. Ausência de bactérias aderidas ao epitélio intestinal. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.



### **5.1.3 Alça proximal inoculada com cultura total**

Os tecidos conjuntivo e epitelial apresentavam-se pouco alterados, sendo que os vasos linfáticos das vilosidades e da submucosa apresentavam-se dilatados. A luz intestinal encontrava-se limpa. Na superfície das vilosidades encontravam-se bactérias aderidas na forma isolada ou de pequenos agregados. Não foram encontradas bactérias no interior das células epiteliais ou na lâmina própria das vilosidades.

### **5.1.4 Alça proximal inoculada com sedimento ressuspenso**

O aspecto da mucosa apresentava-se igual ao descrito anteriormente e o padrão de aderência tem, também, aspecto semelhante, encontrando-se tanto bactérias isoladas como em grupos.

Os cortes histológicos descritos acima não apresentaram diferenças significantes, entre si, indicando não ter havido um efeito lesivo de prováveis toxinas presentes na cultura total da amostra S32 de *C. perfringens* sobre o epitélio intestinal.

### **5.1.5 Alça distal inoculada com cultura total**

O aspecto da mucosa apresentava-se bastante semelhante aos descritos anteriormente. As alças apresentavam bactérias aderidas, tanto isoladas como em grupos, quantitativamente apresentando a mesma distribuição que aquelas da alça proximal. As descrições acima podem ser observadas nas Figuras 8a e 8b, da Prancha V.

### **5.1.6 Alça distal inoculada com sedimento ressuspenso**

A alça encontrava-se na posição do íleo. O aspecto da mucosa também se repetiu aqui e o padrão de aderência dos bacilos foi o mesmo descrito anteriormente, como pode ser observado nas Figuras 9a e 9b, da Prancha V.

A comparação das lâminas preparadas com cortes histológicos das alças inoculadas com cultura total e sedimento ressuspenso mostraram-se bastante semelhantes entre si. A comparação da aderência observada nas alças distais e proximais não apresentou diferenças acentuadas entre si, implicando em uma distribuição, aparentemente homogênea, de receptores para a adesina bacteriana, ao longo de todo intestino delgado.

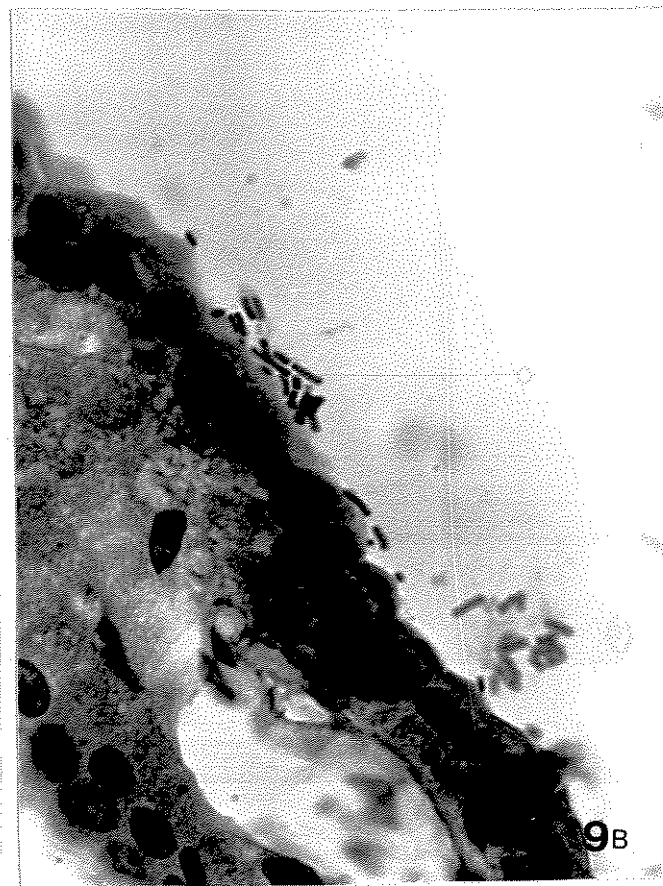
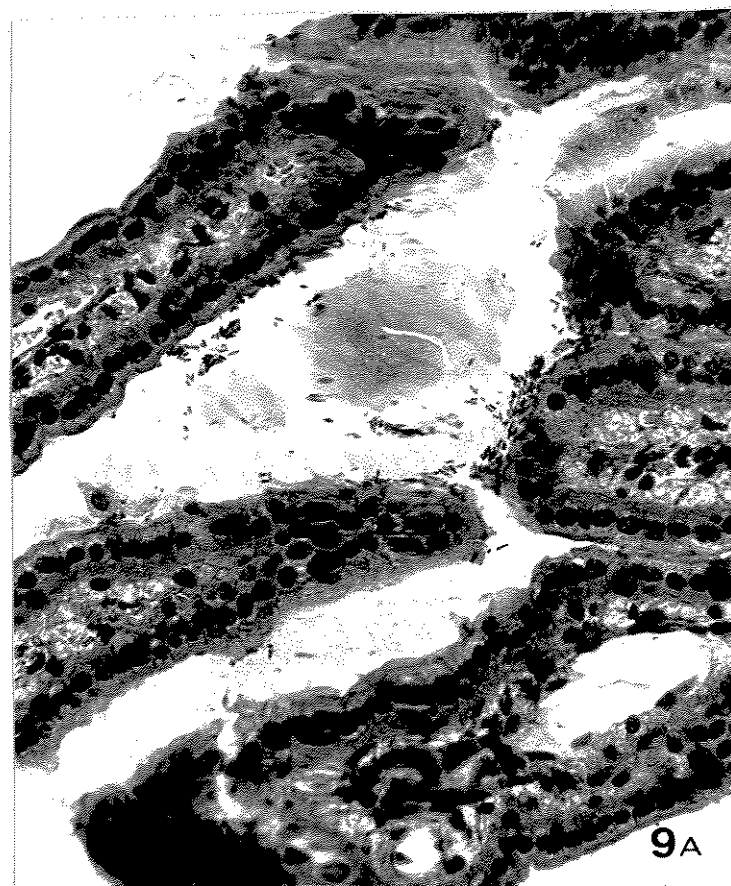
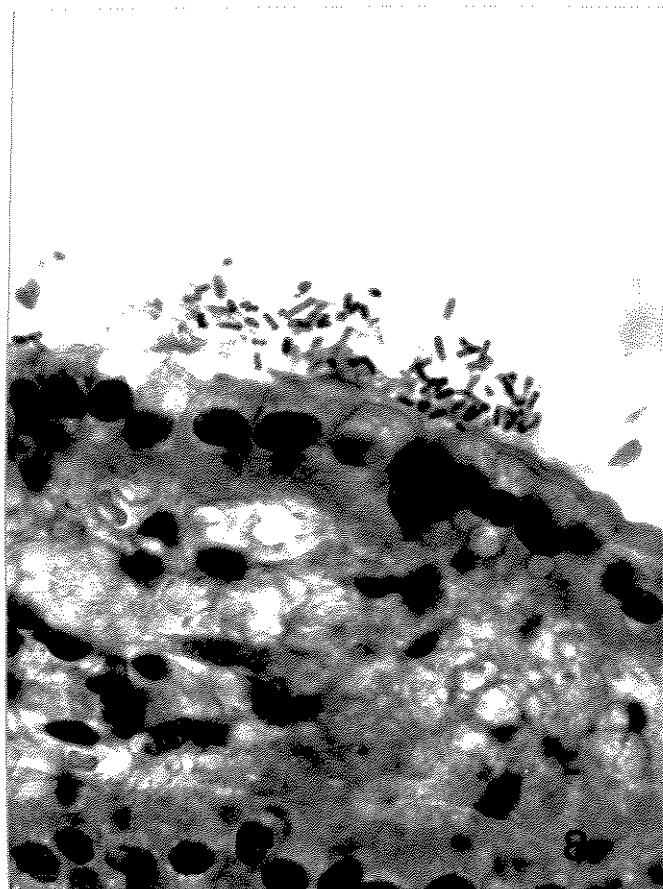
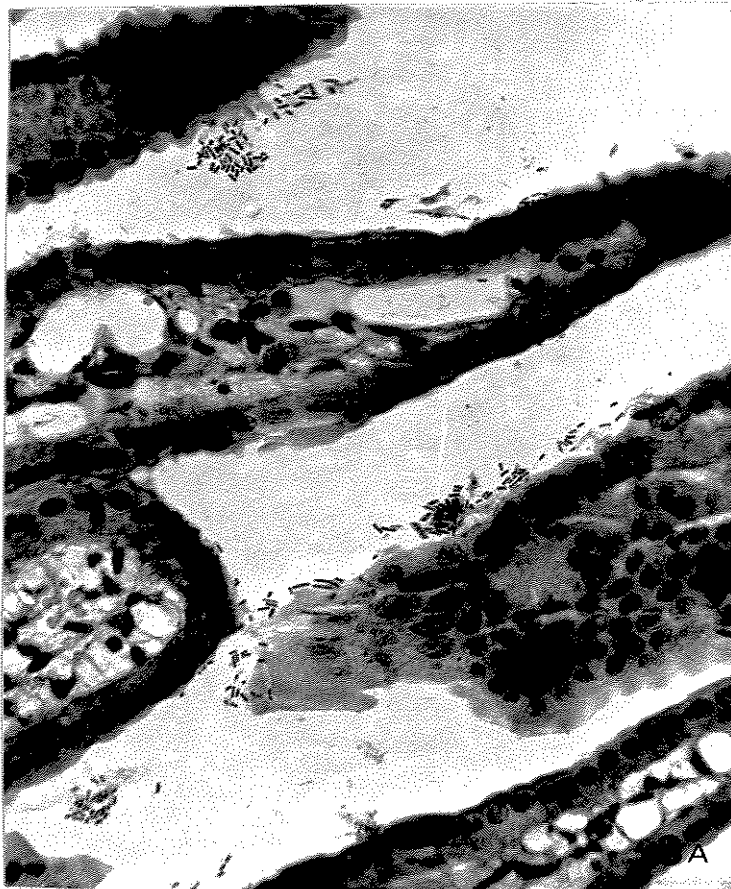
## PRANCHA V

Figura 8a - Corte transversal do intestino delgado após inoculação de cultura total da amostra S32 de **C. perfringens** na posição distal em relação ao estômago. Observar padrão pouco alterado da mucosa intestinal e presença de bacilos aderidos às vilosidades. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.

Figura 8b - Detalhe das bactérias aderidas em agrupamentos à vilosidade intestinal. Coloração pela H/E. Aumento 1000 x.

Figura 9a - Corte transversal do intestino delgado após inoculação do sedimento da cultura da amostra S32 de **C. perfringens** ressuspenso em salina, também na posição distal. Mucosa pouco alterada e bacilos aderidos isolados ou em grupos. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.

Figura 9b - Detalhe da aderência da amostra S32 de **C. perfringens** no contorno da vilosidade intestinal. Coloração pela H/E. Aumento 1000 x.



**5.2 Análise das alças inoculadas com a amostra S32 de C. perfringens no leitão sacrificado após 1 hora da cirurgia.**

**5.2.1 Controle: salina estéril**

Mucosa intestinal pouco alterada. Presença de grande quantidade de vasos congestos, provavelmente decorrente do ponto onde foi executada a amarração da alça, dificultando a drenagem do líquido. Ausência de bactérias aderidas.

**5.2.2 Controle: BHI estéril**

Não há diferenças significativas em relação a descrição feita anteriormente para este mesmo controle, no leitão sacrificado após 3 h da cirurgia.

**5.2.3 Alça proximal inoculada com cultura total**

Epitélio, mucosa e vilosidades pouco afetadas. Vasos linfáticos entumescidos. Bactérias aderidas às vilosidades, preferencialmente, em forma isolada mas aparecendo também pequenos agregados. Presença de bactérias soltas na luz intestinal. Aparentemente há envolvimento de uma camada de muco sobre as vilosidades, comprometida com a aderência das bactérias. A aderência se dá, preferencialmente, nas pontas livres das vilosidades do que nas criptas intestinais.

#### **5.2.4 Alça proximal inoculada com sedimento ressuspenso**

Bactérias aderidas, preferencialmente, em formas isoladas; raros pontos com bactérias agregadas. Presença de bactérias soltas na luz intestinal. Aspecto da mucosa e vilosidades não comprometidos.

#### **5.2.5 Alça distal inoculada com cultura total**

Incidência significativamente maior de bactérias aderidas do que nas lâminas descritas anteriormente. Grande número de agregados bacterianos aderidos às vilosidades intestinais.

#### **5.2.6 Alça distal inoculada com sedimento ressuspenso**

Alça localizada no íleo. Bactérias aderidas tanto na forma isolada como em agregados. Aparentemente não há diferenças quantitativas na adesão dos bacilos em relação a alça proximal, nem em relação ao animal sacrificado após 3 horas de cirurgia.



**5.3 Análise das alças inoculadas com a amostra VPI-115 de C. perfringens no leitão sacrificado após 1 hora de cirurgia.**

**5.3.1 Alças proximais inoculadas com cultura total ou com sedimento ressuspenso**

Padrão de mucosa semelhante aos já descritos anteriormente. Pequena quantidade de bactérias aderidas às vilosidades.

**5.3.2 Alça distal inoculada com cultura total**

Poucas bactérias aderidas; presença de pequenos agregados e também algumas bactérias isoladas.

**5.3.3 Alça distal inoculada com sedimento ressuspenso**

Presença de bactérias aderidas, com claro envolvimento de uma camada de muco que retém os bacilos em pequenos aglomerados. A baixa incidência de bactérias em contato íntimo e direto com as células pode ser explicada pela retenção destas pelo muco presente próximo às vilosidades intestinais. Figuras 10a e 10b, Prancha VI.

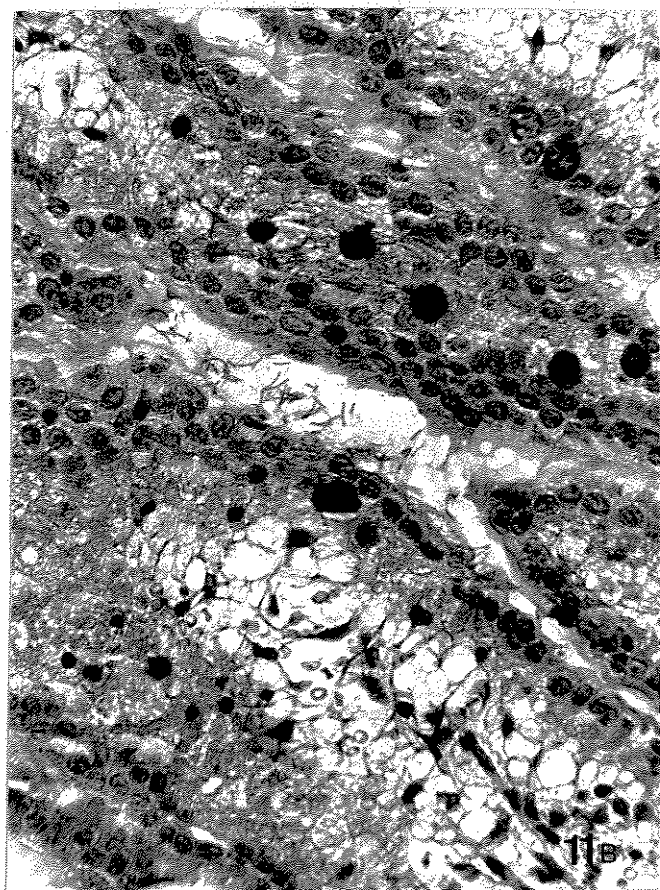
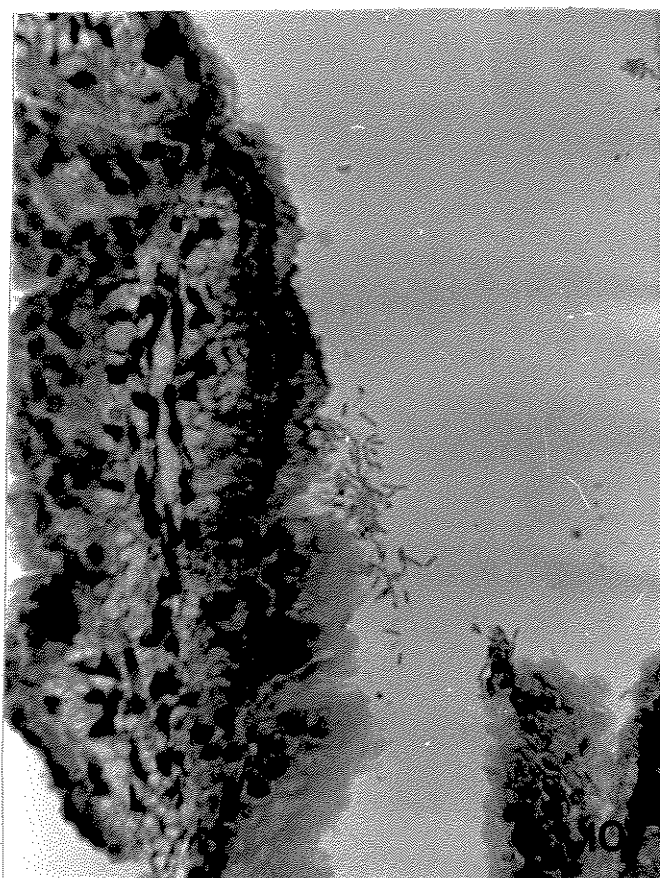
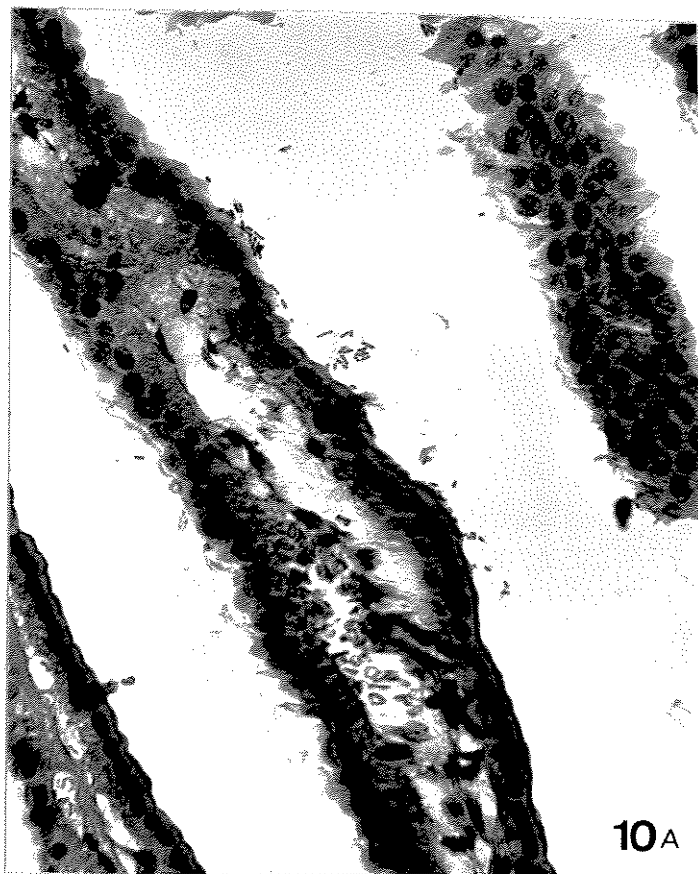
## PRANCHA VI

Figura 10a - Corte transversal do intestino delgado após inoculação do sedimento da cultura da amostra VPI-115 de *C. perfringens* ressuspenso em salina estéril, posição distal. Bactérias aderidas preferencialmente em grupos. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.

Figura 10b - Envolvimento de camada de muco na adesão das bactérias às células epiteliais. Coloração H/E. Aumento 1000 x.

Figura 11a - Corte transversal do intestino delgado após inoculação de cultura total da amostra VPI-115 de *C. perfringens*, posição distal. Observar padrão de aderência dos bacilos tanto na forma isolada como em pequenos agregados. Envolvimento de camada mucosa no processo de aderência. Coloração pela H/E. Aumento 400 x.

Figura 11b - Detalhe da aderência em pequenos agregados da amostra VPI-115 de *C. perfringens*. Coloração pela H/E. Aumento 1000 x.



**5.4 Análise das alças inoculadas com a amostra VPI-115 de C. perfringens no leitão sacrificado após 3 horas da cirurgia.**

**5.4.1 Alças proximais inoculadas com cultura total ou com sedimento ressuspenso**

O padrão da mucosa é igual aos descritos anteriormente. Poucas bactérias aderidas às vilosidades.

**5.4.2 Alça distal inoculada com cultura total**

Presença de numerosas bactérias aderidas, tanto em formas isoladas como em pequenos agregados. A alça inoculada com cultura total apresentou melhor padrão de aderência do que aquela inoculada com o sedimento ressuspenso. Figuras 11a e 11b, Prancha VI.

**5.4.3 Alça distal inoculada com sedimento ressuspenso**

Análise histológica prejudicada por presença de hemorragia. Vasos congestionados, raras bactérias e ausência de aderência.

A análise do teste da alça intestinal ligada, após observação dos cortes histológicos corados pela hematoxilina-

eosina, indica que as amostras examinadas aderem rapidamente ao epitélio intestinal, tendo sido observada aderência após 1 hora da inoculação e que o processo adesivo ocorre ao longo de todo intestino delgado, parecendo, entretanto, serem encontradas concentrações maiores de bactérias aderidas na posição distal em relação ao estômago do animal.

Quanto ao acúmulo de líquido nas alças intestinais, este fenômeno foi observado com a amostra S32 de *C. perfringens*, no leitão sacrificado após 3 h de cirurgia. A amostra VPI-115 não produziu acúmulo de líquido.

#### **5.5 Análise dos cortes transversais de intestino delgado corados pelo método de Gram para visualização de bactérias em cortes de tecido**

A análise dos cortes de intestino, corados pelo método de Gram para tecido, demonstrou a presença exclusiva de bacilos gram-positivos aderidos às vilosidades intestinais dos leitões (Figuras 12 a 14, da Prancha VII). A coloração demonstra a ausência de bactérias da flora normal, pois os cortes feitos das alças intestinais inoculadas com salina e meio de BHI estéreis não apresentavam bactérias. Foi observada aderência de bacilos gram-positivos nas alças inoculadas com as amostras S32 e VPI-115 de *C. perfringens*, indicando que a própria bactéria inoculada foi a recuperada nos cortes, após todo o processamento para fixação, inclusão e coloração.

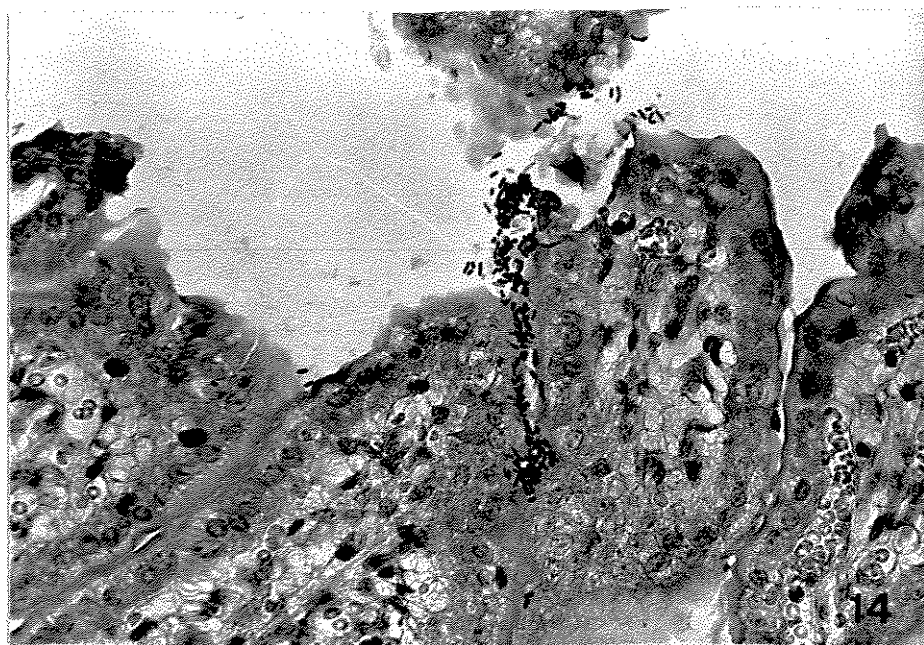
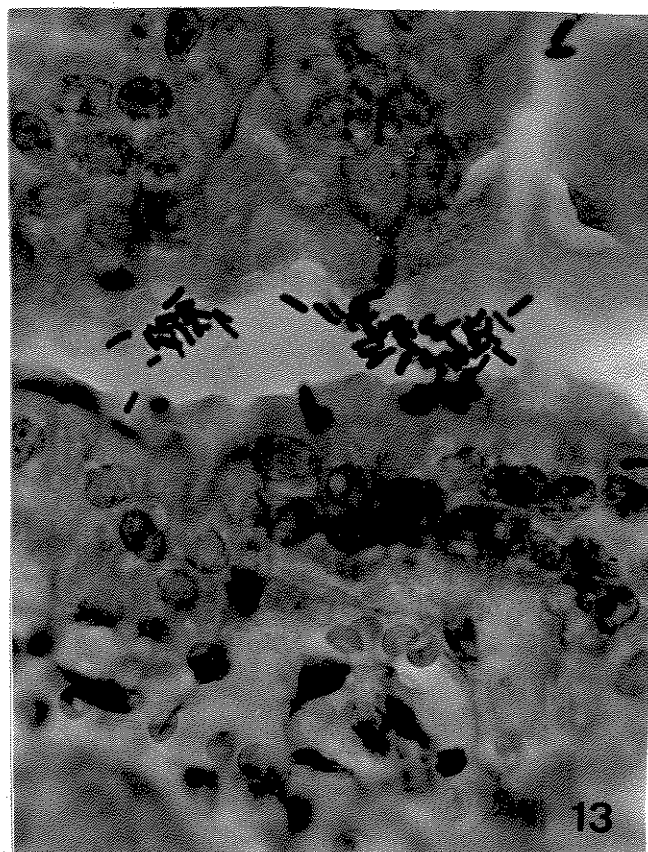
## PRANCHA VII

Cortes transversais de intestino delgado após coloração pelo método de Gram para visualização de bactérias em cortes de tecido.

Figura 12 - Alça intestinal inoculada com a amostra 532 de *C. perfringens* tipo A. Aumento 400 x.

Figura 13 - Alça intestinal inoculada com a amostra 532 de *C. perfringens* tipo A. Aumento 1000 x.

Figura 14 - Alça intestinal inoculada com a amostra VPI-115 de *C. perfringens* tipo C. Aumento 400 x.



## 6 Microscopia eletrônica

### 6.1 Contrastação negativa de amostras de C. perfringens

Através desta técnica, buscamos contrastar estruturas de natureza proteica presentes sobre a superfície bacteriana. Nossos resultados não se mostraram muito promissores neste sentido. A maioria das amostras examinadas mostraram-se desprovidas de qualquer estrutura de superfície com exceção da amostra S32 de **C. perfringens**, que apresentava uma estrutura frouxa de superfície, de natureza não fimbrial e que se desprendia com facilidade da membrana celular, como pode ser visto na Figura 15, da Prancha VIII. A maioria das outras amostras examinadas tinha aspecto semelhante ao apresentado pela amostra JAB-1 de **C. perfringens**, como demonstrado pela Figura 16 da Prancha VIII.

### 6.2 Secção ultrafina de amostras de **C. perfringens**

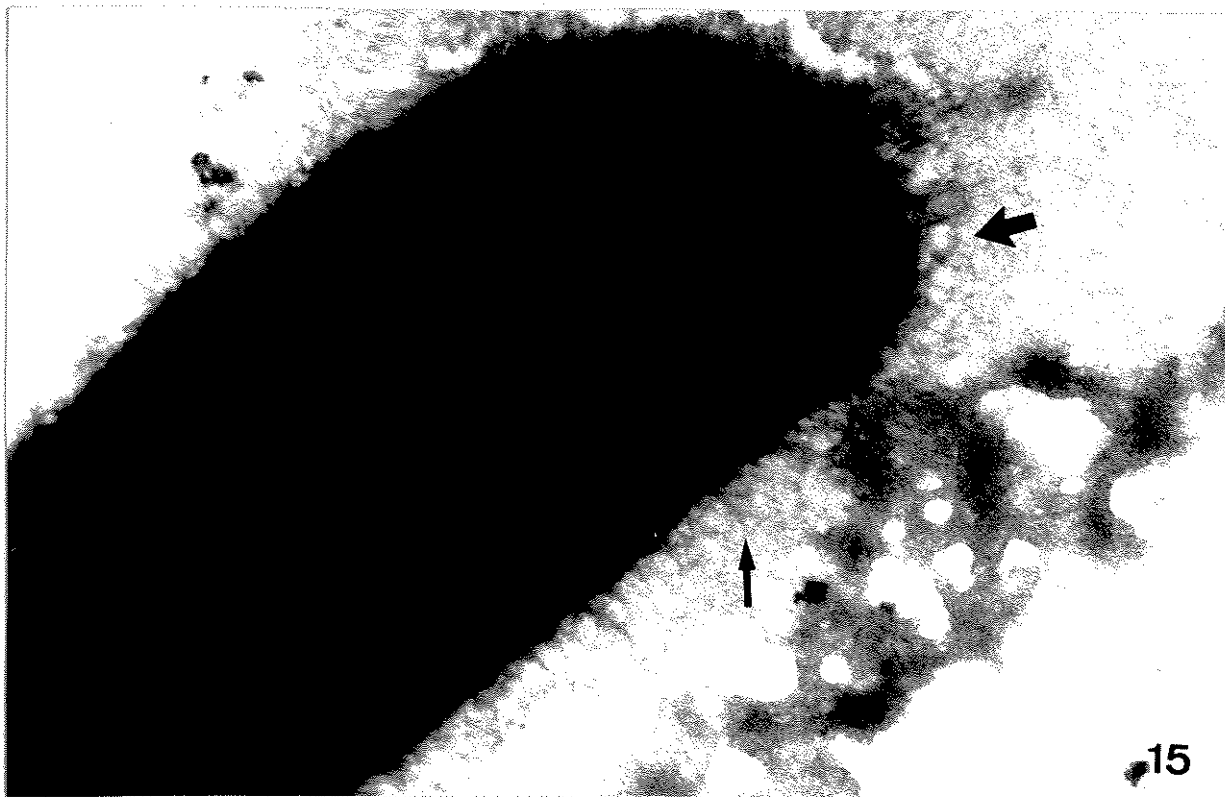
Após exame de nossas amostras de **C. perfringens**, ao microscópio eletrônico, contrastadas com ácido fosfotúngstico, procedemos a inclusão de quatro amostras, selecionadas de acordo com os resultados dos testes apresentados anteriormente, em resina Epon, com e sem coloração pelo vermelho de rutênio, técnica esta específica para visualização de estruturas de superfície de natureza polissacarídica



## PRANCHA VIII

Figura 15 - Amostra S32 de *C. perfringens* contrastada com ácido fosfotúngstico a 1%. Observar estrutura frouxa na superfície da célula bacteriana. Aumento 94.400 x.

Figura 16 - Amostra JAB-1 de *C. perfringens* contrastada com ácido fosfotúngstico a 1%. Ausência de estruturas de superfície. Aumento 31.000 x.



(glicocálice). Para execução do método, procedemos também a processo de estabilização das possíveis estruturas superficiais, com antissoro anti-bactéria total, ficando os grupos controle e teste assim divididos:

A. amostras não tratadas com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio;

B. amostras tratadas com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio;

C. amostras tratadas com antissoro e coradas pelo vermelho de rutênio;

D. amostras não tratadas com antissoro e coradas pelo vermelho de rutênio.

As amostras selecionadas para inclusão em resina Epon 812 foram S32, JAB-1, VPI-115 e 208 de *C. perfringens*. Os resultados obtidos serão apresentados a seguir e ilustrados com fotomicrografias.

#### **6.2.1 Amostras não tratadas com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio**

Este grupo serviu como um controle negativo deste método, não tendo havido estabilização de estruturas de superfície pelo uso do antissoro e assim, conseqüentemente, a visualização de qualquer estrutura, sensível ao processo de desidratação, ficou dificultada.

O exame das amostras ao microscópio eletrônico mostrou células desprovidas de cobertura de superfície, com exceção da amostra S32 de *C. perfringens* que parece possuir uma estrutura frouxa associada à superfície bacteriana, como pode ser observado na Figura 17, da Prancha IX. As outras amostras apresentavam-se desprovidas deste tipo de estrutura, conforme exemplificado pela amostra JAB-1, na Figura 18, da Prancha IX.

#### 6.2.2 Amostras tratadas com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio

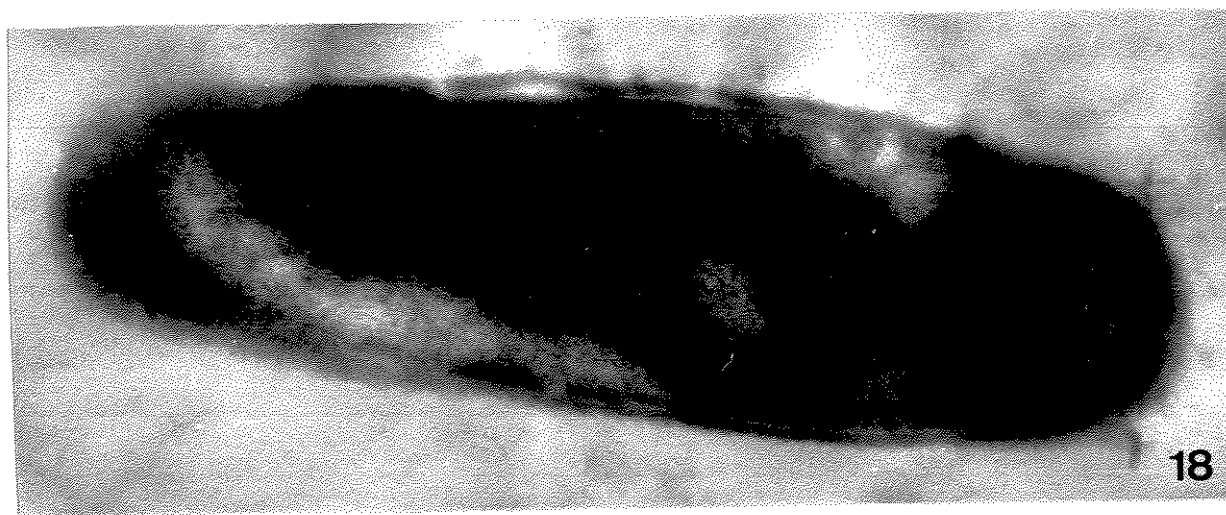
As quatro amostras de *C. perfringens* foram tratadas com antissoro preparado em coelho contra a amostra S32. O processo de estabilização de estruturas de superfície foi efetivo para a amostra tratada com seu antissoro específico mas não o foi para as outras amostras, possivelmente por estas apresentarem-se desprovidas do mesmo tipo de estrutura de superfície. Apesar da ausência de coloração pelo vermelho de rutênio, foi possível discriminarmos uma estrutura frouxa e delicada sobre a superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, como demonstrado na Figura 19, da Prancha X. As outras amostras examinadas apresentaram-se desprovidas deste tipo de estrutura.

## PRANCHA IX

Cortes ultra finos de amostras de *C. perfringens* encapsuladas em ágar 4%. Fixação pelo glutaraldeído 5% e pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 1%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

Figura 17 - Amostra S32 de *C. perfringens* tipo A sem tratamento com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio. Difícil visualização de estruturas na superfície das células bacterianas. Aumento 47.400 x.

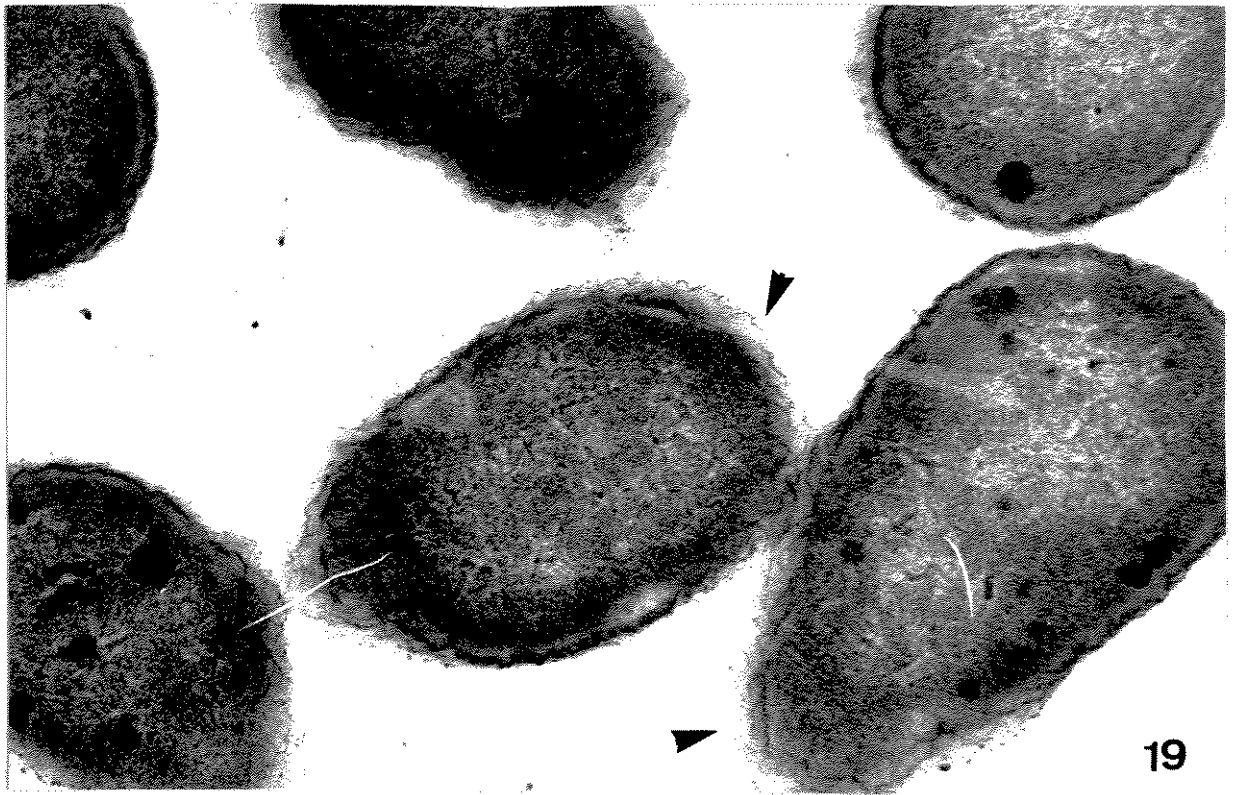
Figura 18 - Amostra JAB-1 de *C. perfringens* sem tratamento com antissoro e sem coloração pelo vermelho de rutênio. Ausência de estruturas na superfície bacteriana. Aumento 60.200 x.



## PRANCHA X

Corte ultra-fino de uma amostra de *C. perfringens* encapsulada em ágar 4%. Fixação pelo glutaraldeído 5% e pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 1%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

Figura 19 - Amostra S32 de *C. perfringens* após estabilização da estrutura de superfície por tratamento com antissoro anti-amostra S32 (bactéria total). Observar estruturas finas na superfície bacteriana. Aumento 60.200 x.





### **6.2.3 Amostras tratadas com antissoro e coradas pelo vermelho de rutênio**

O tratamento recebido por este grupo permitiu a estabilização de estruturas polissacarídicas hidratadas, bem como sua visualização através de coloração específica. As amostras JAB-1, 208 e VPI-115 mostraram-se desprovidas de estrutura de superfície. Por outro lado, a amostra S32 apresentou estruturas bem definidas em sua superfície, com arranjo fibrilar, estendendo-se de uma célula a outra e irradiando-se em diferentes direções, como ilustrado nas Figuras 20 e 21, da Prancha XI.

### **6.2.4 Amostras não-tratadas com antissoro e coradas pelo vermelho de rutênio**

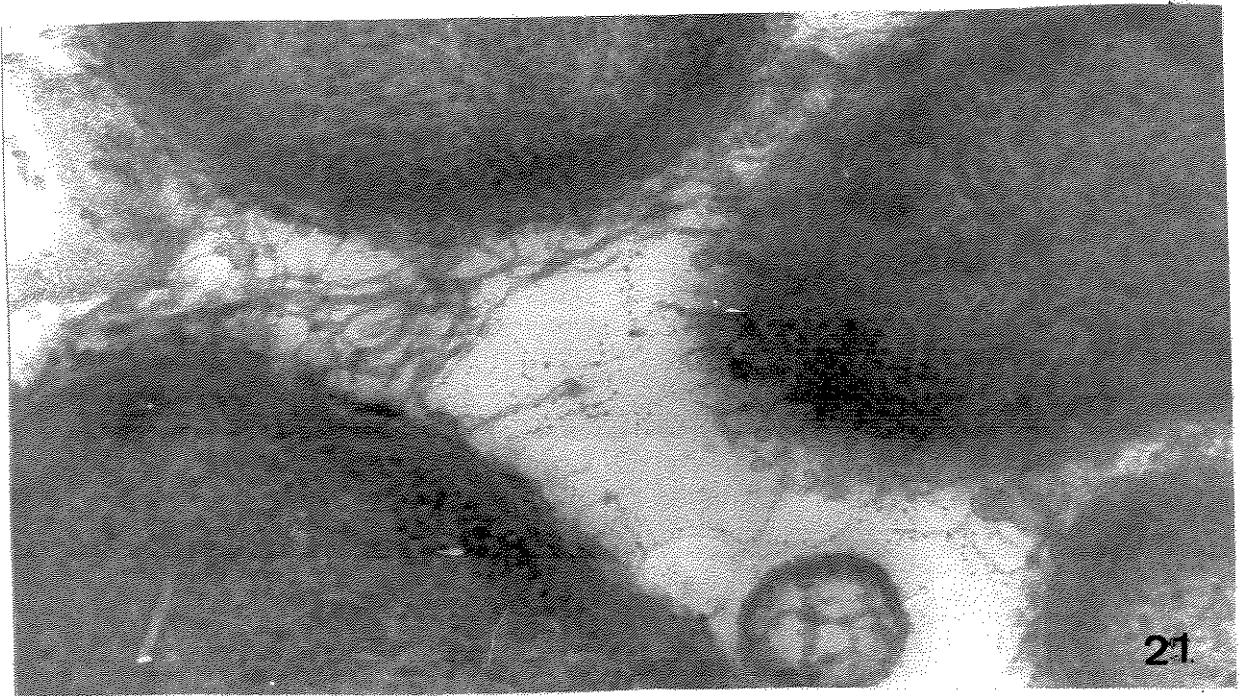
O tratamento recebido, por este grupo, possibilitou a observação do desaparecimento da estrutura de superfície presente sobre a amostra S32 de *C. perfringens* pois, sem a estabilização com antissoro, a estrutura fibrilar presente em sua superfície deve ter se condensado junto a parede durante o processo de desidratação, tornando difícil sua visualização (resultado não apresentado em fotografias). As outras amostras mantiveram o mesmo padrão apresentado anteriormente.

## PRANCHA XI

Corte ultra-fino de uma amostra de *C. perfringens* encapsulada em ágar 4%. Fixação pelo glutaraldeído 5% e pós fixação pelo tetróxido de ósmio 1%. Coloração com vermelho de rutênio. Contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Figura 20 - Amostra S32 de *C. perfringens* tipo A após estabilização de estruturas de superfície pelo uso de antissoro e coloração pelo vermelho de rutênio. Observar presença de estruturas fibrilares presentes na superfície bacteriana. Aumento 46.500 x.

Figura 21 - Detalhe ampliado das estruturas de superfície da amostra S32 de *C. perfringens*. Aumento 94.400 x.



#### IV DISCUSSÃO

É do conhecimento geral que a colonização das superfícies de células animais é um evento inicial importante na patogênese de infecções bacterianas em animais e no homem (BEACHEY, 1981). Considerando-se que poucas informações existem na literatura, a respeito do processo de colonização utilizado por amostras de *C. perfringens*, em seu processo de fixação à mucosa intestinal, resolvemos estudar os mecanismos de aderência em amostras de *C. perfringens* "in vitro" e "in vivo", buscando elucidar através de qual tipo de estrutura esta espécie bacteriana promove sua aderência ao epitélio intestinal.

A maioria dos fatores adesivos conhecidos capacitam a bactéria a aglutinar eritrócitos e por isso são chamados hemaglutininas, tendo sido a técnica de hemaglutinação, uma das primeiras utilizadas por muitos pesquisadores, para o estudo das adesinas em geral (DUGUID & OLD, 1980).

Nossos estudos de hemaglutinação foram desenvolvidos em placas de microtítulo contendo 96 poços, ao contrário dos estudos da hemaglutinina de *C. perfringens* desenvolvidos em tubo, por COLLEE, 1961. Essa técnica foi escolhida depois de termos examinado aglutinação em lâmina e em tubos de ensaio, sem resultados satisfatórios (resultados não apresentados).

Os testes de microhemaglutinação com amostras de *C. perfringens* mostraram-se positivos e foram feitos inicialmente partindo-se tanto de culturas em meios sólidos (Tabela 1), como em meios líquidos (Tabela 2), obtendo-se resultados satisfatórios com ambos os modos de cultivo, sendo, entretando, os títulos aglutinantes mais altos conseguidos com as amostras cultivadas em meio de BHI líquido. Os estudos de COLLEE, porém, encontraram um melhor padrão hemaglutinante com amostras cultivadas em ágar-sangue, meio este que não nos ofereceu bons resultados. Devido às facilidades técnicas conferidas pelo cultivo de bactérias anaeróbias em meio líquido, utilizamos o meio de BHI para todos os experimentos subsequentes.

Duas observações importantes, mencionadas por COLLEE, foram relevantes em nosso estudo da hemaglutinina do *C. perfringens*. Uma delas diz respeito a presença de uma hemolisina que interferia na leitura das reações de hemaglutinação. Em nossos testes também nos deparamos com este problema e sabemos que este tipo de atividade em amostras de *C. perfringens* se deve principalmente a ação da alfa toxina, uma fosfolipase C que hidroliza lecitina em fosforilcolina e um diglicerídeo (KRIEG & HOLT, 1984). Esta toxina exerce seu efeito letal por lise de membranas celulares, presumivelmente como consequência da hidrólise da lecitina de membrana. Assim, tentamos neutralizar o efeito hemolítico das células de *C. perfringens* através de tratamentos com antissoro específico

anti-lecitinase, reação com suspensão de gema-de-ovo (fonte de lecitina) e calor (resultados não apresentados). Os três tipos de tratamento foram capazes de eliminar o efeito hemolítico das amostras examinadas mas, inconvenientemente, aboliram também a capacidade hemaglutinante destas amostras.

A outra observação importante mencionada por COLLEE diz respeito ao aparecimento da capacidade hemaglutinante em amostras de *C. perfringens*. Em seu trabalho, amostras recém-isoladas não apresentavam capacidade aglutinante, vindo esta surgir após 3 a 4 meses de cultivo, em repiques seriados. Em nosso trabalho, amostras de *C. perfringens* recém-isoladas ou mantidas em culturas-estoque sem repiques frequentes conservavam sua capacidade hemaglutinante. Entretanto, esta se perdia depois de repiques seriados e, buscando uma explicação para este fenômeno, encontramos na literatura a revisão de COSTERTON et alii, 1981.b, onde afirma-se que a maioria das células bacterianas, em todos os ambientes, encontra-se envolvida por uma matriz aniônica fibrosa, denominada glicocálice. Quando uma bactéria é isolada e cultivada em um meio adequado, o glicocálice produzido por suas células deixa de ser necessário pois nestas condições não há pressão seletiva exigindo a aderência da bactéria em busca de nutrientes. Desta forma, consideramos possível a explicação de que os subcultivos repetidos das amostras atenuam ou eliminam a produção de estruturas de superfície responsáveis pela aglutinação dos eritrócitos neste tipo de reação.

Vamos, em seguida, tecer alguns comentários sobre os fatores que influenciam a reação de MHA de amostras de *C. perfringens*. O efeito da concentração bacteriana foi estudado (Tabela 3) e concluímos que os melhores títulos aglutinantes eram obtidos quando partíamos de suspensões bacterianas densas para a realização das diluições do teste. Esta característica de alta concentração bacteriana pode sugerir uma distribuição não muito grande de estruturas de superfície responsáveis pela aglutinação de hemácias sobre a célula bacteriana e, conseqüentemente, necessitando de um número maior de microrganismos para fazer as pontes entre as hemácias e promover sua aglutinação.

O efeito do pH nas nossas reações de MHA é compatível com as observações de COLLEE. Na faixa de pH de 6,2 a 8,0 não foram observadas diferenças significantes nos títulos hemaglutinantes, sendo os pHs 7,0 e 7,4 os que possibilitaram a obtenção dos títulos mais elevados (resultados não apresentados).

O efeito da temperatura foi examinado sobre a reação de MHA e concluímos que as amostras de *C. perfringens* reagem com hemácias a temperatura de 4°, 37°C e temperatura ambiente, com algumas variações nos títulos obtidos nestas diferentes temperaturas (Tabela 4). As reações a temperatura ambiente ofereceram os títulos aglutinantes mais elevados tanto com o sedimento bacteriano como com o sobrenadante da cultura. O

efeito da temperatura também foi estudado sobre o cultivo das amostras. Amostras de **C. perfringens**, cultivadas a 18°C, demonstraram uma redução no título hemaglutinante, embora não se tenha observado uma abolição da capacidade aglutinante das amostras estudadas (Tabela 5). Estas observações, quando comparadas àquelas com **Escherichia coli** (JONES, 1977), cujo cultivo a 18°C abole a capacidade de hemaglutinação das amostras, falam a favor de um tipo de estrutura diferente das fímbrias apresentadas por estas amostras de **E. coli**.

DUGUID & OLD, 1980, em revisão sobre as propriedades adesivas das enterobactérias, abordaram a influência da D-manose sobre as fímbrias desta família de bactérias. Em nossos estudos, foi observado que este açúcar não influenciava o padrão hemaglutinante das amostras de **C. perfringens** em reações realizadas a temperatura ambiente (Tabela 6) ou a 4°C (resultados não apresentados). O uso de sedimento bacteriano e sobrenadante das culturas apresentou o mesmo padrão aglutinante com ou sem a presença de manose. Isto sugere que este açúcar não funciona como receptor para as estruturas de superfície do **C. perfringens** e que estas, não devem apresentar características semelhantes às fímbrias presentes nas enterobactérias.

A maioria das amostras hemaglutinantes de **C. perfringens** apresentaram reação de MHA positiva tanto com o sedimento bacteriano como com o sobrenadante da cultura,



devendo-se isto ao caráter solúvel, das estruturas responsáveis pela aglutinação das hemácias, presentes na superfície das amostras examinadas. Assim, podemos concluir que a hemaglutinina de **C. perfringens** deve encontrar-se ligada às células bacterianas e também daí se desprender durante o processo de multiplicação destas, apresentando-se na forma livre, no meio onde se encontra o microrganismo (Tabela 7).

As reações de MHA com as diversas amostras de **C. perfringens** foram realizadas frente a seis diferentes tipos de hemácias, sendo que não foi possível delinear nenhum padrão de aglutinação, apesar de uma predominância de aglutinação frente a hemácias de cobaia, seguida por galinha e carneiro (Tabela 7). As hemácias de coelho foram sempre altamente aglutinadas pelas amostras de **C. perfringens**, entretanto, estas apresentaram algumas reações de aglutinação inespecífica, o que não pode deixar de ser ressaltado, visto também ser observado em relação a outras bactérias (LEITE, YANO & PESTANA DE CASTRO, 1988).

O tratamento térmico a 60°C, por 10 min, de amostras de **C. perfringens**, afetou o padrão aglutinante da reação (Tabela 8). Para algumas amostras o título permaneceu inalterado, para outras, o tratamento diminuiu o título aglutinante e por fim, outras amostras apresentaram um padrão aglutinante melhor após o tratamento recebido. Estes resultados foram variáveis na dependência do tipo de hemácia

usado na reação e o aumento observado no título da mesma, após o aquecimento, pode sugerir a exposição de antígenos de superfície responsáveis pela aglutinação de um determinado tipo de hemácia.

Um dos últimos parâmetros estudados dentro da reação de MHA foi a influência da hemina sobre o título aglutinante de algumas amostras de *C. perfringens*. Tem sido demonstrado por GREGORY & FANNING, 1983, que a adição de hemina ao meio de cultivo aumenta a atividade da catalase intracelular, o que tem o efeito de melhorar a aerotolerância das células bacterianas. Como a hemina é uma substância rotineiramente empregada em meios de cultivo de bactérias anaeróbias estritas, imagina-se que sua presença melhore as condições fisiológicas das bactérias em cultivo, passando estas a expressar anexos de superfície normalmente presente sobre a superfície bacteriana, em condições patológicas, no hospedeiro. MCKEE, et alii, 1986, estudaram a influência da hemina sobre a fisiologia e virulência de amostras de *Bacteroides gingivalis*, com resultados positivos, havendo um aumento da expressão de fímbrias por este microrganismo, quando cultivado em presença desta substância. Nossos estudos da influência da hemina sobre a reação de MHA de amostras de *C. perfringens* não se mostraram satisfatórios, não havendo elevação dos títulos hemaglutinantes das amostras cultivadas em presença de diferentes concentrações desta substância (dados não apresentados).

Para concluir nossos comentários sobre o teste de MHA, podemos dizer que, em sua essência, nossos resultados diferem daqueles de COLLEE, 1961, no que diz respeito a ocorrência da hemaglutinina do **C. perfringens**. COLLEE preconizou que esta hemaglutinina não ocorria naturalmente, nas amostras de **C. perfringens** mas apenas em culturas velhas e já esporulando, devendo representar uma forma degradada de enzimas ativas sobre polissacarídeos da superfície celular. Nossas observações, entretanto, nos levam a pensar que a estrutura de superfície presente sobre as amostras de **C. perfringens** fazem parte integral de suas células, sendo útil para a fixação destas a seus substratos. Além disso, observamos que esta hemaglutinina desaparece após repiques seriados, culturas velhas e estocagem por longos períodos de tempo, a exemplo do que acontece com outros tipos de fatores de virulência, tal como a produção de toxina LT (termolábil) por amostras enterotoxigênicas de **Escherichia coli** (GATTI, SERAFIM, PESTANA DE CASTRO & MONTEIRO, 1986). Para enfatizar esta observação, notamos que nossas amostras pertencentes aos grupos II e III, cedidas por laboratórios que as mantinham estocadas já por algum tempo, mantiveram por pouco tempo sua capacidade hemaglutinante enquanto que a amostra S32 de **C. perfringens**, isolada recentemente em nosso laboratório, tem mantido suas características em melhores condições do que as isoladas há mais tempo.

As observações acima também falam a favor de estruturas do tipo glicocálice presentes sobre a superfície da bactéria pois, segundo COSTERTON et alii, 1981.b, este tipo de estrutura é facilmente perdida em cultivos em laboratório, por não haver pressões seletivas exigindo sua produção pelas células bacterianas.

O teste de MHA por nós empregado é uma ferramenta útil na pesquisa de fatores de aderência em várias espécies bacterianas, particularmente dentro da família **Enterobacteriaceae**, bem como espécies pertencentes aos gêneros **Corynebacterium** e **Neisseria**, mas seu uso isolado normalmente pode levar a erros potencialmente graves, pois nem sempre confirma se há uma relação direta com a aderência "in vivo". Por exemplo, bactérias rugosas, devido a sua agregação espontânea, podem dar reações de hemaglutinação falso-positivas. O antígeno 987P de **Escherichia coli**, em condições normais, não é hemaglutinante, embora seja reconhecidamente um dos fatores de colonização mais importantes em ETEC (**E. coli** enterotoxigênicas). Assim, após a realização da padronização de todas as condições do teste e tendo sido examinada uma boa variedade de tipos de hemácias, foram analisadas as variações de nossos resultados, não facilmente explicáveis, e concluímos que seria útil estendermos nossa abordagem utilizando um outro modelo celular. Escolhemos para isto uma linhagem contínua de células - células HeLa - de origem humana, pois este modelo

tem sido bastante usado nos estudos da aderência de outras bactérias (SCALETSKY et alii, 1984).

Assim, utilizando informações contidas na literatura adaptamos o teste de aderência em células HeLa, buscando, neste modelo celular, reproduzir "in vitro", o mecanismo de aderência utilizado pelas amostras de **C. perfringens** para aderirem a seus substratos naturais. Após a padronização da técnica em relação a quantidade de inóculo bacteriano a ser empregado (0,1 ml de uma suspensão bacteriana de concentração correspondente a escala 10 de Mac Farland) e ao tempo de contato das bactérias com as células HeLa (30 min), procedemos a uma triagem de algumas de nossas amostras neste teste, obtendo-se um resultado bastante satisfatório (Tabela 9). A amostra 532 de **C. perfringens** apresentou-se altamente aderente neste modelo celular, funcionando, a partir deste experimento, como padrão positivo de aderência do **C. perfringens**. Algumas outras amostras, como a VIII, a 64 e a CWC-26 foram consideradas pouco aderentes e as restantes examinadas, não aderentes, por apresentarem um índice de aderência inferior a 1,00 bactéria/célula.

Após obtenção destes resultados, dispúnhamos de duas informações que indicavam a presença de estruturas adesivas sobres a superfície de amostras de **C. perfringens**: estas, eram capazes de aglutinar eritrócitos e se ligaram a células eucarióticas. Nossos estudos foram, então, direcionados em

relação a fatores que afetavam a produção e a integridade desta estrutura, alterando a ligação da bactéria às células HeLa.

Muitos fatores de virulência das bactérias são componentes de superfície ou produtos extracelulares tais como cápsulas, toxinas e enzimas e sua síntese e secreção pode ser acentuadamente afetada pelas condições de crescimento. Sabe-se que alguns destes fatores só podem ser expressos durante o crescimento sob condições específicas encontradas "in vivo", enquanto que outros fatores potenciais, identificados em laboratório, podem ter pouco ou nenhum papel na patogênese (MCKEE et alii, 1986). Assim, quando estudamos fatores de virulência de patógenos em laboratório, é importante levar em conta que as condições de crescimento sejam o mais parecidas possíveis com aquelas que prevalecem no hospedeiro.

Assim, cultivamos algumas amostras de **C. perfringens** em diferentes meios de cultura e verificamos que, para a amostra 532, altamente aderente, a variação no tipo de meio de cultivo afetou a produção da estrutura de superfície (Tabela 10). O meio de "Columbia Agar Base" não foi propício para o desenvolvimento da adesina desta amostra, enquanto que o meio de BHI mostrou-se satisfatório tanto em sua forma líquida como sólida. Entretanto, examinando-se uma amostra considerada não-aderente, pudemos notar que as variações nos meios de cultivo não levaram à expressão de estruturas em sua superfície

capazes de mediar aderência em células HeLa (Tabela 10). Este mesmo fenômeno ocorreu quando cultivamos nossas amostras em presença de diferentes concentrações de hemina. Sabe-se da literatura que o crescimento de diversas bactérias gram-negativas patogênicas é limitado pela disponibilidade de íons ferro (BROWN, ANWAR & LAMBERT, 1984; LAM, TURNOWSKY, SHWARZINGER & NERUDA, 1984; JONSON, SVENNERHOLM & HOLMGREN, 1989). Microrganismos como **Bacteroides** spp. não conseguem utilizar ferro livre e, conseqüentemente, eles têm afinidade pelo grupo heme e outras proteínas transportadoras de íons ferro (MCKEE et alii, 1986). Como o **C. perfringens** é uma espécie bacteriana que utiliza ferro como um nutriente essencial, baseamo-nos no trabalho de MCKEE et alii, 1986, com **Bacteroides gingivalis** e cultivamos nossas amostras em presença de diferentes concentrações de hemina. Os resultados não foram satisfatórios. A amostra S32 de **C. perfringens** continuou apresentando sua aderência característica (resultados não apresentados) com índice de adesão de  $25,35 \pm 2,95$  bactérias/célula em ausência de hemina e  $24,43 \pm 2,07$  bactérias/célula em presença de  $25 \mu\text{g}$  de hemina/ml de meio de cultivo. O exame desta amostra ao microscópio eletrônico de transmissão após contraste com ácido fosfotúngstico e tendo sido cultivada em presença de hemina (5, 10 e  $25 \mu\text{g/ml}$ ) revelou uma espécie de cápsula grosseira circundando a célula bacteriana (resultados não apresentados) mas que não tinha influência no padrão de aderência às células HeLa. A presença de hemina também não favoreceu a expressão de adesinas em

amostras não aderentes. A amostra 208 apresentou índice de adesão de  $1,70 \pm 0,05$  bactérias/célula em ausência de hemina e de  $1,66 \pm 0,11$  bactérias/célula em presença de  $25 \mu\text{g/ml}$  de hemina.

Novas tentativas de modificações no meio básico de cultivo do *C. perfringens* consistiram no acréscimo de diferentes concentrações de  $\alpha, \alpha'$ , dipiridil (Sigma), um agente quelante de íons ferro. Baseando-nos em um trabalho de JONSON et alii, 1989, com *Vibrio cholerae* e em um trabalho de SNIPES, HANSEN & HIRSH, 1988, com *Pasteurella multocida*, sendo que em ambos, o cultivo das amostras bacterianas em meio contendo um quelante de íons ferro levava a expressão de "outer membrane protein" (OMP), de alto peso molecular, cuja função "in vivo" precisa ser determinada mas que podem funcionar como adesinas. No caso de nossas amostras de *C. perfringens*, o cultivo em condições de privação de ferro não levou à expressão de estruturas externas nas células bacterianas, tendo havido, isto sim, um efeito bastante negativo sobre o crescimento das amostras, visto que os íons ferro são nutrientes essenciais para o desenvolvimento do *C. perfringens* (dados não apresentados).

Em estudos subsequentes, pesquisamos a natureza química da estrutura de superfície sobre a amostra S32 de *C. perfringens*, tratando-a com duas enzimas proteolíticas - tripsina e protease. O tratamento com tripsina, nas



concentrações de 0,25 e 2,00 mg/ml, causou uma desnaturação parcial da adesina de superfície, reduzindo em cerca de 80% o índice de adesão desta amostra, em relação ao seu controle (Tabela 11). A enzima protease, por sua vez, não afetou a ligação da amostra S32 às células HeLa, quando usada nas concentrações de 0,0125 e 0,25 mg/ml (Tabela 11). Duas hipóteses podem explicar este resultado: ou esta enzima não atua em nenhum sítio exposto sobre a estrutura da superfície bacteriana ou as quantidades de enzima utilizadas no experimento foram insuficientes para verificarmos algum efeito desnaturante. Este experimento, quando realizado com quantidades maiores de enzima (0,25, 2,00 e 10,00 mg/ml), tornou-se inviável pois resíduos de enzima, que permaneciam na suspensão bacteriana, destruíam a monocamada de células HeLa. Este tipo de problema não foi observado com o uso da tripsina pois as células HeLa são adaptadas, em seu cultivo, ao tratamento com esta enzima.

Para concluir, este experimento nos indicou a presença de substâncias de natureza proteica, sensíveis ao tratamento pela tripsina, fazendo parte da adesina da amostra S32 de *C. perfringens*.

A seguir, foi também abordado em nossos estudos, a possível existência de estruturas de natureza polissacarídica, fazendo parte da adesina de superfície desta amostra de *C. perfringens*, tratando-se esta, com diferentes concentrações de

metaperiodato de sódio, um agente oxidante de substâncias polissacarídicas.

Assim, à semelhança do que FULLER, 1975, observou com *Lactobacillus* em relação à sua aderência às células do papo da galinha, o tratamento da amostra S32 de *C. perfringens*, com diferentes concentrações de metaperiodato, aboliu sua capacidade de se ligar às células HeLa, como demonstrado na Tabela 12, podendo-se observar, inclusive, um efeito dose-resposta: conforme diminuimos a concentração do agente oxidante de carboidratos, notamos uma recuperação no índice de adesão da bactéria.

Este experimento indicou a presença de estruturas de natureza polissacarídica presentes sobre a superfície da amostra S32 de *C. perfringens* e, juntamente com os resultados obtidos com o experimento descrito anteriormente, podemos supor a existência, nesta amostra, de uma adesina de natureza glicoproteica.

Estes dados sugerem a presença de uma estrutura do tipo glicocálice sobre a superfície da bactéria, mediando sua aderência a eritrócitos e a células eucarióticas, à semelhança do que ocorre com *Lactobacillus* (FULLER, 1975; BROOKER & FULLER, 1975). Observações de COSTERTON et alii, 1981.a, a respeito deste tipo de estrutura, em muitas espécies bacterianas, são altamente relacionadas com as nossas.

A perda deste tipo de estrutura em cultivos seriados por falta de uma pressão seletiva exigindo sua produção pela célula bacteriana, sua sensibilidade a oxidação pelo metaperiodato e principalmente sua sensibilidade a desidratação nos métodos convencionais de inclusão para microscopia eletrônica de transmissão, falam a favor de um glicocálice mediando a aderência desta espécie bacteriana a seus substratos naturais. Entretanto, como acontece com outras bactérias gram-positivas, como os estreptococos (BEACHEY & OFEK, 1976) e os estafilococos (ALY & LEVIT, 1987), não podemos descartar a possibilidade do envolvimento de ácido lipoteicoico (LTA) na adesão do *C. perfringens* às células eucarióticas. Estas células apresentam um grande conteúdo de fibronectina em sua superfície e esta molécula, uma glicoproteína de alto peso molecular, serve como receptor para o LTA da superfície de bactérias gram-positivas (SIMPSON, COURTNEY & OFEK, 1987). Alguns resultados obtidos em testes de inibição da aderência em células HeLa falam a favor desta possibilidade e serão analisados a seguir.

O primeiro aspecto abordado em relação a inibição da aderência em células HeLa foi o caráter solúvel da estrutura de superfície da amostra S32 de *C. perfringens*. Em geral, quando realizamos os testes de microhemaglutinação, utilizando o sobrenadante de amostras de *C. perfringens* em meio de BHI, foram obtidos títulos hemaglutinantes iguais e até superiores a aqueles obtidos com a suspensão bacteriana. Assim,

resolvemos investigar se o sobrenadante da amostra S32 em BHI era capaz de impedir competitivamente a aderência desta amostra às células HeLa. Nossos resultados, altamente repetitivos, demonstraram a presença, no sobrenadante, de uma substância capaz de reduzir em cerca de 50% a adesão da bactéria às células HeLa, quando o sobrenadante era usado puro, diluído 1/2 ou 1/10 (Tabela 14). Diluições superiores não se apresentaram lineares, demonstrando que, possivelmente, a concentração da substância inibidora da aderência presente em uma cultura de 18 h, era relativamente baixa.

Nesta fase de nosso trabalho, não tínhamos ainda indícios claros da natureza química da adesina do *C. perfringens* mas, supondo que parte dela fosse de natureza proteica, procuramos concentrá-la a partir de sobrenadantes da amostra S32 de *C. perfringens* cultivada em BHI, por precipitação com sulfato de amônio. Os resultados obtidos, com várias concentrações de sulfato de amônio, indicaram não ter havido uma concentração efetiva da substância inibidora da aderência (Tabela 16), pois não foi conseguido mais do que 50% de inibição, o que já era observado com o sobrenadante puro, sem ter recebido qualquer tratamento. Mesmo assim, procedemos a uma dosagem das proteínas (HARTREE, 1972) e dos polissacarídeos (DUBOIS et alii, 1956) presentes nestas frações do sobrenadante precipitado e obtivemos um teor elevado destas duas substâncias na faixa de precipitação onde não foi encontrada inibição de aderência (60-80% de saturação)

e um teor baixo nas faixas de precipitação onde observamos inibição (mistura das frações 0-20, 20-45 e 45-60% de saturação) (Tabela 17). Concluímos, então, que o tratamento com sulfato de amônio não foi efetivo na concentração da estrutura de superfície solúvel da amostra S32 de *C. perfringens* pois, embora haja um conteúdo proteico nesta estrutura, sua proporção parece ser pequena em relação ao conteúdo polissacarídico e, durante o processo de precipitação e diálise, podemos supor que a porção polissacarídica deve ter se perdido, levando aos resultados apresentados. Por outro lado, sabemos que o ácido lipoteicóido (LTA) também é uma molécula facilmente encontrada em sobrenadantes de culturas de outras espécies de bactérias gram-positivas (BEACHEY & COURTNEY, 1987). Assim, o processo de concentração por tratamento com sulfato de amônio, não seria adequado para precipitação do LTA, caso esteja esta substância, também envolvida no processo de aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às células HeLa.

Outra abordagem, por nós realizada, em termos de inibição da aderência, foi o tratamento de nossa amostra com antissoro preparado em coelho contra a bactéria total (amostra S32). Na preparação do antígeno para inoculação nos animais, empregamos duas técnicas diferentes: uma, tratando a bactéria pelo calor e outra, pelo formol. O tratamento pelo calor consistia em uma série de lavagens, em salina fisiológica, da suspensão bacteriana, além de seus aquecimento a 100°C por 30

min, enquanto aquele com formol, foi mais brando, não exigindo lavagens seriadas das células bacterianas sendo sua utilização considerada adequada para produção de anticorpos contra antígenos proteicos.

Os resultados obtidos, com o teste de inibição da aderência pelo uso de antissoros, demonstraram que estes se ligavam às bactérias, impedindo sua aderência às células HeLa. O soro produzido com a bactéria morta pelo calor foi capaz de inibir a adesão da amostra S32 até uma diluição de 1/640, a partir da qual não se observaram diferenças significativas no índice de aderência (Tabela 18). O soro produzido com a bactéria morta pelo formol também foi capaz de inibir a aderência da amostra S32, tendo sido observada inibição até a diluição de 1/160, quando, então, o índice de adesão retornou aos níveis observados com o controle da reação (Tabela 19). Os antissoros preparados em coelho, contra a amostra S32 de *C. perfringens*, continham anticorpos contra diversas estruturas presentes na célula bacteriana. Uma pequena porcentagem destes anticorpos eram dirigidos contra estruturas presentes sobre a superfície da bactéria como pode ser comprovado pela sua reação com o extrato desta amostra bacteriana, obtido pelo tratamento com ácido clorídrico, em teste de imunodifusão em gel de ágar (Prancha III) e pelo fato deste antissoro ter sido capaz de estabilizar a estrutura de superfície presente sobre a amostra S32, nas preparações para microscopia eletrônica, como demonstrado na Prancha XI.

Entretanto, os resultados dos experimentos de inibição da aderência pelo uso dos antissoros homólogos não se devem exclusivamente a estes anticorpos dirigidos contra estrutura de superfície mas a uma mistura de anticorpos, dirigidos também contra o corpo bacteriano, pois, o tratamento da amostra S32 com antissoro preparado contra a amostra 64 de **C. perfringens** levou, também, a uma inibição significativa da aderência (Tabela 20).

Outro fenômeno de inibição da aderência observado foi após o tratamento da amostra S32 de **C. perfringens** com um soro normal de coelho (Tabela 20). Aqui, duas hipóteses podem ser relacionadas com o fenômeno observado. A primeira é de que o animal possa ter desenvolvido anticorpos anti-**Clostridium perfringens** através de um contato natural com esta bactéria, visto ela ser amplamente distribuída em ambientes naturais, sem caráter patogênico. Uma outra hipótese, menos viável, encontraria apoio no envolvimento de ácido lipoteicóico na aderência da amostra S32 de **C. perfringens** às células HeLa, pois o soro normal contém moléculas de fibronectina solúvel que podem se ligar ao ácido lipoteicóico presente na parede bacteriana, impedindo assim sua ligação às células (MCKEDOWN-LONGO, 1987).

Para completar nossos experimentos de aderência em células HeLa, procedemos a dois processos de extração ácida, buscando retirar substâncias presentes sobre a superfície da

amostra S32 de *C. perfringens*, usando-as como inibidor da aderência desta amostra. O extrato preparado com ácido acético não foi efetivo no processo de inibição, como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 21. Entretanto, a extração com ácido clorídrico, talvez por ser um processo um pouco mais vigoroso, foi capaz de retirar substâncias presentes sobre a amostra S32 e inibir em cerca de 50% sua aderência em células HeLa, quando utilizado puro (Tabela 21).

A fim de verificarmos se os soros produzidos contra a amostra S32 eram capazes de reconhecer alguma substância extraída pelo ácido clorídrico, realizamos um teste de imunodifusão em gel e os resultados obtidos demonstraram que tanto o antissoro preparado com a amostra S32 morta pelo calor como aquele preparado com a amostra inativada pelo formol reconheceram estruturas extraídas desta amostra pelo tratamento com ácido clorídrico, enquanto que nenhuma linha de precipitação foi obtida por reação dos antissoros com o extrato obtido com ácido acético (Prancha III). Os controles deste experimento, extratos ácidos da amostra JAB-1 de *C. perfringens*, considerada não aderente em células HeLa, não foram reconhecidos pelos antissoros preparados contra a amostra S32, indicando que, nestes antissoros, haviam anticorpos dirigidos contra as estruturas de superfície da amostra S32.



Dois estudos ainda foram realizados a respeito da natureza da estrutura adesiva da amostra S32 de **C. perfringens**: um de resistência térmica e outro de hidrofobicidade.

Quanto aos tratamentos térmicos, procedemos de duas formas diferentes: uma tratando a bactéria total a diferentes temperaturas e outra tratando-se apenas o sobrenadante, usado como inibidor, também a diferentes temperaturas. Os resultados obtidos indicaram que, tanto num caso como no outro, um tratamento térmico vigoroso é capaz de desnaturar a estrutura de superfície da amostra S32 de **C. perfringens**. Esta desnaturação, como visto, independe da adesina estar ligada a célula bacteriana ou solúvel no sobrenadante de sua cultura. Estas observações falam a favor de um caráter relativamente termo-sensível da adesina da amostra S32 de **C. perfringens**, sugerindo que a inativação da parte proteica da provável glicoproteína envolvida na aderência, altera a capacidade de adesão da amostra.

Quanto ao teste de hidrofobicidade, os resultados demonstraram que a adesina presente em amostras de **C. perfringens** não lhes conferia caráter hidrofóbico (Tabela 22), ao contrário do que ocorre quando fímbrias estão presentes em amostras de **E. coli** (HONDA et alii, 1983). Aqui, entretanto, é necessário fazer-se uma ressalva quanto ao método empregado. Temos lido na literatura, que métodos de medida da

hidrofobicidade de superfície de células bacterianas são extremamente falhos (DILLON et alii, 1986), sendo necessário o emprego concomitante de vários métodos a fim de obter-se uma medida mais precisa. Em nosso caso, por problemas técnicos, não pudemos lançar mão de métodos mais sofisticados para podermos afirmar, categoricamente, a não existência de um caráter hidrofóbico nas amostras de **C. perfringens** examinadas.

Assim, baseados nos aspectos teóricos abordados na introdução deste trabalho e nos resultados obtidos no transcorrer de nossa pesquisa, sugerimos a existência de uma estrutura do tipo glicocálice presente sobre a superfície da amostra S32 de **C. perfringens**, responsável pelo rompimento da distância repulsiva entre a célula bacteriana e seu substrato (célula do epitélio intestinal) mediando, assim, a adesão desta espécie bacteriana ao trato intestinal, para posterior desenvolvimento da doença (COSTERTON et alii, 1981.b; ARP, 1988; BUSSCHER & WEERKAMP, 1987).

Enfim, para complementar e ilustrar nosso trabalho, realizamos ainda um teste de adesão "in vivo", tentando reproduzir no intestino delgado de leitões recém-nascidos a aderência observada com a amostra S32 de **C. perfringens** em células HeLa. Nossos resultados foram bastante satisfatórios, tendo sido observada uma aderência não só da amostra S32 mas também da amostra VPI-115 de **C. perfringens**, usada inicialmente, no teste como um controle negativo, pois esta

amostra não é aderente "in vitro", quando utilizamos células HeLa como modelo para adesão (Pranchas V e VI).

Neste teste, pudemos fazer algumas observações interessantes, no que diz respeito ao local e modo de adesão das amostras bacterianas. Utilizando-se tanto cultura-total como suspensão bacteriana em salina estéril, após centrifugação, obtivemos aderência sem diferenças significativas, demonstrando que possíveis toxinas liberadas no meio de cultura, durante o processo de cultivo, não interferiram no processo de aderência por destruição do tecido das vilosidades. A centrifugação branda a que as culturas foram submetidas e sua ressuspensão em salina estéril também não afetaram a estrutura da bactéria, tendo esta se mantido íntegra para o processo de aderência.

A distribuição de receptores ao longo do trato intestinal foi outra preocupação que norteou a execução deste teste. A aplicação da mesma suspensão bacteriana, em pontos diferentes do intestino delgado, demonstrou que a adesão se dá de uma maneira relativamente uniforme, por todo o intestino, parecendo não haver uma concentração de receptores em pontos específicos do intestino. Não foi examinado, neste teste, se esta espécie bacteriana também promove sua aderência no intestino grosso.

Uma observação importante neste teste é sua utilização como modelo para estudo de aderência com amostras de *C. perfringens*, visto que a amostra VPI-115 de *C. perfringens*, que não era aderente em células HeLa, mostrou-se aderente neste modelo. Este fato pode significar que, "in vivo", existem condições que favorecem o aparecimento de estruturas de superfície que não são produzidas em condições de laboratório, como acontece também com outras espécies bacterianas como o *Vibrio cholerae* (JONSON et alii, 1989) e a *Pasteurella multocida* (SNIPES et alii, 1988).

Aproveitamos a confecção dos cortes histológicos dos segmentos intestinais dos leitões usados no teste da alça ligada, procedemos a uma coloração de Gram para visualização de bactérias em cortes histológicos e os resultados obtidos também foram satisfatórios. Os cortes assim corados demonstraram a presença exclusiva de bacilos gram-positivos circundando as vilosidades intestinais (Prancha VII), ressaltando que as bactérias que estão sendo demonstradas como aderentes ao epitélio intestinal são aquelas por nós inoculadas e não bactérias previamente residentes neste local. Para reforçar este fato, tivemos a preocupação de utilizar alças intestinais inoculadas com meio de BHI e salina fisiológica estéreis como controles, demonstrando nestes cortes histológicos (Prancha IV) uma total ausência de bactérias aderidas às vilosidades. Isto foi possível porque utilizamos animais recém-nascidos que não receberam nenhum

tipo de alimentação ou água até o momento da cirurgia e que nasceram de cesariana, de leitões criados em condições especiais.

Nosso teste de aderência "in vivo" está em concordância com o estudo histológico realizado por ARBUCKLE, 1972, de casos de enterite necrótica em leitões, cuja observação foi a de aderência de amostras de *C. perfringens* tipo C em torno das vilosidades intestinais destes animais. O relato de um caso de enterite necrótica em potros, por SIMS et alii, 1985, também notificando a visualização de bacilos gram-positivos, identificados como *C. perfringens* tipo C, em torno das vilosidades intestinais, vem reforçar nossa hipótese de que esta espécie de bactéria executa um estágio de adesão no intestino delgado, anterior ao processo de esporulação e produção de toxinas.

Para concluir nosso trabalho de pesquisa, só nos faltava visualizar, através de técnicas de microscopia eletrônica, a existência de alguma estrutura de superfície sobre a amostra S32 de *C. perfringens*. Assim, utilizamos inicialmente, a técnica de contrastação negativa, sem, entretanto, conseguirmos visualizar estruturas bem definidas em nossas amostras. A amostra S32, que apresentava resultados positivos de aderência em células HeLa, parecia ter uma estrutura tênue em sua superfície, definida como uma "penugem"

no contraste com ácido fosfotúngstico (Figura 15, Prancha VIII).

Esta observação, somada aos resultados preliminares de alguns testes, nos levaram a incluir algumas amostras em resina Epon, tendo-se como objetivo básico neste método, utilizar o corante vermelho de rutênio, específico para estruturas de natureza polissacarídica, visto que nossos resultados sugeriam a presença de uma estrutura de tipo glicocálice, presente sobre a amostra S32 de *C. perfringens*.

Os resultados obtido foram satisfatórios, tendo sido possível visualizarmos a estrutura de superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, após sua estabilização com antissoro, produzido contra a bactéria total e coloração com vermelho de rutênio, confirmando a existência de uma estrutura do tipo glicocálice, presente na superfície da bactéria e responsável pela sua aderência aos modelos celulares utilizados.

Os controles utilizados, incluindo uma amostra não aderente, JAB-1, demonstraram que esta era completamente desprovida de estruturas de superfície, conforme demonstrado pelo método empregado (Figura 18, Prancha IX).

Este glicocálice, visualizado sobre a superfície da amostra S32 de *C. perfringens*, pode estar em íntima associação com o ácido lipoteicóico da parede celular desta espécie

bacteriana ou com outras estruturas, possivelmente de natureza proteica, presentes sobre a superfície celular, promovendo a aderência de amostras de *C. perfringens* a seus substratos naturais.

Com estes resultados e considerações, acreditamos estar contribuindo com informações importantes para o conhecimento do processo de interação deste microrganismo com as células do epitélio intestinal, evento este supostamente relevante para a colonização do intestino por esta bactéria. Esta pesquisa vem, também, abrir novas perspectivas de estudo dentro do assunto, havendo muitos pontos para serem explorados. Dentre os pontos que nos parecem mais promissores estão:

a) a purificação desta adesina de superfície através de métodos convencionais, além de sua completa caracterização química;

b) a produção de antissoros específicos contra a adesina e sua utilização em testes de inibição da aderência "in vitro" e "in vivo";

c) desenvolvimento e padronização de testes sorológicos para detecção de amostras aderentes de *C. perfringens*, podendo-se utilizar extratos ácidos da bactéria como antígeno para este tipo de reação;

d) desenvolvimento de um possível novo modelo celular para estudo de aderência de **C. perfringens**, baseado nos resultados de nosso teste de adesão nas alças intestinais de leitões, utilizando enterócitos purificados destes animais.

e) projeto, desenvolvimento e averiguação da utilidade prática de vacinas produzidas a partir da adesina de superfície do **C. perfringens**, com a finalidade de evitar o alto grau de mortalidade observado em granjas de suínos acometidos por enterite necrótica;

f) desenvolver estudos com amostras de **C. perfringens** isoladas de casos de enterite necrótica em bebês recém-nascidos, com a finalidade de verificar se, à semelhança do que acontece em animais, estas amostras também apresentam estruturas de superfície capazes de promover a adesão da bactéria ao epitélio intestinal humano, buscando esclarecer possíveis mecanismos úteis na prevenção e terapêutica desta enfermidade.



## V CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo investigar a presença de estruturas de superfície presentes em amostras de **C. perfringens**, agente causal de intoxicação alimentar no homem e enterocolite necrotizante em animais recém-nascidos. Com esta finalidade, foram utilizadas as técnicas de microhemaglutinação, aderência em células HeLa, testes de inibição da aderência, microscopia eletrônica de varredura e adesão "in vivo", usando neste caso leitões recém-nascidos como modelo de estudo.

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. O exame de nossas amostras de **C. perfringens**, em teste de MHA, demonstrou a presença de uma substância hemaglutinante solúvel, instável e facilmente perdida após cultivos sucessivos em laboratório;

2. A realização do teste de MHA frente a diferentes tipos de hemácias, demonstrou uma aglutinação mais intensa de hemácias de cobaia e galinha, não se podendo, entretanto, classificar as amostras examinadas segundo um padrão fixo de hemaglutinação;

3. O tratamento térmico das amostras de *C. perfringens* aboliu parcialmente seus títulos hemaglutinantes. A temperatura de realização do teste de MHA (4°C, 37°C e temperatura ambiente) bem como aquela de cultivo das amostras (18° e 37°C), não influenciaram significativamente os títulos hemaglutinantes;

4. O cultivo das amostras de *C. perfringens* em diferentes meios de cultura, a variação do pH do tampão diluente desta reação e o acréscimo de hemina ao meio de cultivo não influenciaram os títulos aglutinantes frente às hemácias examinadas;

5. O exame de várias amostras de *C. perfringens* em teste de aderência em células HeLa, selecionou uma amostra altamente aderente, denominada S32, amplamente estudada no decorrer deste trabalho;

6. O padrão de aderência da amostra S32 de *C. perfringens* se modificava na dependência do meio de cultivo empregado, sendo o meio de BHI o que se mostrou mais indicado para o cultivo da bactéria com esta finalidade. O acréscimo de hemina e  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , dipiridil ao meio de cultivo, não melhoraram o padrão de aderência das amostras examinadas;

7. O tratamento enzimático com tripsina levou a amostra S32 de *C. perfringens* a perder parcialmente sua

capacidade de aderência às células HeLa, sugerindo a presença de estrutura proteica envolvida na adesão;

8. O tratamento com metaperiodato de sódio levou a amostra S32 de *C. perfringens* a perder totalmente sua capacidade de aderência às células HeLa, sugerindo a presença de uma estrutura polissacarídica envolvida na adesão;

9. O tratamento térmico da amostra S32 de *C. perfringens* bem como de seu sobrenadante em BHI inativou parcialmente a adesina de superfície, diminuindo sua adesão a células HeLa, sugerindo que a desnaturação da parte proteica de uma provável glicoproteína de superfície, afeta o processo de adesão;

10. Testes de inibição da aderência da amostra S32 de *C. perfringens* pelo uso de seu sobrenadante em meio de BHI apresentou resultados positivos, dando 50% de inibição com o sobrenadante usado puro ou diluído até 1/10, confirmando o caráter solúvel desta adesina. A precipitação deste sobrenadante com diferentes concentrações de sulfato de amônio não separou efetivamente a adesina da amostra S32, indicando que sua constituição predominante não é proteica;

11. Testes de inibição da aderência a células HeLa da amostra S32 de *C. perfringens* com antissoro produzido em coelho contra a bactéria total morta tanto pelo calor como

pelo formol foram positivos, estando envolvidos neste processo tanto anticorpos dirigidos contra estruturas de superfície presentes na amostra como aqueles dirigidos contra o corpo bacteriano;

12. Soros heterólogos, produzidos contra a amostra 64 de *C. perfringens*, também foram capazes de inibir a adesão da amostra S32 às células HeLa, indicando a presença de anticorpos dirigidos contra o corpo bacteriano envolvidos no processo de inibição;

13. Extrato obtido por tratamento da amostra S32 com ácido clorídrico foi capaz de inibir a aderência desta amostra de *C. perfringens* às células HeLa, e seus antígenos foram reconhecidos, em teste de imunodifusão em gel de ágar, por antissoros homólogos;

14. Testes de hidrofobicidade com várias amostras de *C. perfringens*, não demonstraram caráter hidrofóbico nas amostras examinadas;

15. Testes de aderência realizados em alças intestinais de leitões recém-nascidos demonstraram a aderência da amostra S32 de *C. perfringens* às vilosidades intestinais, sugerindo a expressão, "in vivo", de uma adesina de superfície;

16. O teste de aderência "in vivo" foi um modelo eficiente, tendo sido possível verificar adesão com amostras não aderentes (*C. perfringens* VPI-115) nos testes feitos em células HeLa. A aderência observada, com as amostras examinadas, ocorreu em toda a extensão do intestino delgado, não se observando distribuição irregular de receptores ao longo deste;

17. A contrastação negativa das amostras de *C. perfringens* e seu exame ao microscópio eletrônico demonstrou a presença de estrutura tênue apenas sobre a superfície da amostra S32;

18. A inclusão de algumas amostras de *C. perfringens* em resina Epon, distribuídas em vários grupos-controle, demonstrou que o tratamento da amostra S32 com antissoro específico e uso do corante vermelho de rutênio foram passos necessários para estabilização e visualização da estrutura de superfície presente sobre esta amostra, indicando ser a mesma um glicocálice de natureza predominantemente polissacarídica.

Os resultados obtidos, analisados em conjunto, em colaboração com dados existentes na literatura sobre os mecanismos de aderência das bactérias em geral, nos permitem concluir que amostras de *C. perfringens*, exemplificadas pela S32, podem apresentar estrutura de superfície do tipo glicocálice, capaz de mediar sua aderência ao epitélio

intestinal e iniciar aí, um processo de colonização de células vegetativas, que precede, nas relações parasita-hospedeiro, outros passos como esporulação, produção de enterotoxina e eventualmente a liberação direta de várias citotoxinas, como a do tipo beta, envolvida na enterocolite necrotizante.

Esperamos, com este trabalho, ter aberto uma série de perspectivas, principalmente no que tange a esclarecimentos, ainda não definidos, das fases iniciais da intoxicação alimentar no homem e sobretudo da enterocolite necrotizante nos animais e também em crianças recém-nascidas.

## VI RESUMO

A intoxicação alimentar no homem, causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A e a enterocolite necrotizante, doença letal para animais recém-nascidos, produzida provavelmente pelo *C. perfringens* tipo C são patologias atribuídas a produção de toxinas. No entanto, nos estudos sobre estas doenças há uma lacuna no que diz respeito a possíveis mecanismos de aderência de formas vegetativas do *C. perfringens* que lhe permitiriam colonizar a mucosa intestinal do homem e animais. Assim, o presente trabalho busca esclarecer os mecanismos de aderência a nível intestinal de amostras de *C. perfringens* isoladas de diferentes origens. Um grande número de amostras foi examinado por métodos de microhemaglutinação com hemácias de várias espécies animais (galinha, cobaia, cavalo, boi, carneiro, coelho e humana), por testes de aderência em células HeLa, técnicas de microscopia eletrônica, aderência "in vivo" utilizando-se leitões recém-nascidos e tratamento das amostras bacterianas com substâncias específicas. Os resultados obtidos nos testes de microhemaglutinação demonstraram a existência de uma hemaglutinina instável, responsável principalmente pela aglutinação de hemácias de cobaia e galinha e altamente solúvel no meio de cultivo, sendo responsável, no sobrenadante, pela aglutinação destes mesmos tipos de hemácias. Nos testes de aderência em células HeLa foi detectada uma amostra altamente aderente (amostra S32),

algumas pouco aderentes e a maioria, não aderente. Estudos de fatores que afetavam a aderência nestas células demonstraram que: o meio de BHI era o que melhor adaptava as bactérias para o teste; o tratamento térmico vigoroso abolia parcialmente a capacidade de adesão da amostra; o tratamento da amostra com enzima proteolítica (tripsina) abolia parcialmente sua capacidade de aderência e o tratamento com metaperiodato de sódio abolia completamente a capacidade de aderência da amostra S32. Testes de inibição da aderência em células HeLa com o sobrenadante da cultura em BHI inibia a adesão em cerca de 50% quando usado puro ou diluído até 1/10; inibição com antissoro preparado em coelho contra a bactéria total deu resultados positivos até diluição de 1/640. Exames da amostra S32 ao microscópio eletrônico de transmissão através de técnica de contraste com ácido fosfotúngstico (PTA) ou por inclusão em resina EPON após coloração com vermelho de rutênio demonstrou a presença de estruturas externas na superfície da bactéria, do tipo glicocálice. Esta estrutura apresenta natureza polissacarídica mas parece estar ligada a estruturas proteicas ou ácido lipoteicóico da parede bacteriana. A presença desta adesina sobre a superfície de amostras de *C. perfringens*, media sua ligação a células intestinais, como demonstrado por teste de aderência "in vivo" em leitões recém-nascidos, após fixação do material e processamento histológico com coloração pela hematoxilina-eosina e coloração de Gram para tecidos. Assim, este trabalho demonstra que à ingestão de células vegetativas de *C. perfringens* se segue um estágio de



fixação das bactérias às vilosidades intestinais para subsequente esporulação e produção de toxinas, causando as doenças próprias de cada tipo de *C. perfringens*.

## VII SUMMARY

**In vitro and in vivo adherence of *Clostridium perfringens* types A and C isolated from different sources.**

In intestinal toxin infections caused by *C. perfringens* in man and animals an essential preliminary step, which mediates the adhesion of bacterial cells to the gut epithelium, is not yet known. In this study, it was found that most strains from many food and animal had haemagglutinating properties which was lost with subculturing and had no correlation with adhesion studied in HeLa cells and by the ileal loop assay in newborn piglets.

One strain (S32) isolated from pig enterotoxemia adhered quite well to HeLa cells (adhesion index = 30 bact/cell). Thermal treatment of the bacteria abolished this adhesion partially as well as trypsin. Sodium metaperiodate destroyed completely the adhesive properties of S32. The examination at electron microscope using ruthenium red and antiserum against S32 bugs demonstrated the presence of external structures on the bacterial surfaces which resembled glicocalix. No fimbrial structures could be seen by phosphotungstic acid staining. The ileal loop assay showed a very strong adherence in vivo as detected by histological techniques and appropriate staining of the preparations by HE and by Gram's method.

These data altogether suggest that the polysaccharide component of the glycocalix, which may contain small amounts of protein, could be an adhesin for *C. perfringens* types A and C in their respective intestinal diseases they cause in man and animals.

## VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, R.; SHINEFIELD, H. R.; LITZ, C. & MALBACH, H. I. Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, **141**(4): 463-465, 1980.
- ALY, R. & LEVIT, S. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev. Infect. Dis.*, **9** suppl. 4: S341-S350, 1987.
- ARBUCKLE, J. B. R. The attachment of *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. *J. Pathol.*, **106**(2): 65-72, 1972.
- ARP, L. H. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In: **Virulence mechanisms of Bacterial Pathogens** (Roth, J. A., ed.). American Society for Microbiology, Washington, Cap. 3, p. 03, 1988.
- BARTUS, H.; ACTOR, P.; SNIPES, E.; SEDLOCK, D. & ZAJAC, I. Indications that the erythrocyte receptor involved in enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment is a sialoglycoconjugate. *J. Clin. Microbiol.*, **21**(6): 951-954, 1985.

- BATTY, I. & WALKER, P. D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. *J. Path. Bact.*, **85**: 517-521, 1963.
- BAYER, E. A.; KENIG, R. & LAMED, R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.*, **156**(2): 818-827, 1983.
- BAYER, E. A.; SETTER, E. & LAMED, R. Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.*, **163**(2): 552-559, 1985.
- BAYER, E. A. & LAMED, R. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J. Bacteriol.*, **167**(3): 828-836, 1986.
- BEACHEY, E. H. & OFEK, I. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M-protein. *J. Exp. Med.*, **143**: 759-771, 1976.
- BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, **143**(3): 325-345, 1981.
- BEACHEY, E. H. & COURTNEY, H. S. Bacterial adherence: the attachment of group A streptococci to mucosal surfaces. *Rev. Infect. Dis.*, **9-Supl. 5**: S475-S481, 1987.

- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**, 20a ed, Comp. Melhoramentos, São Paulo, pp 408, 530, 569, 1980.
- BISHOP, O. N. **Statistics for Biology**, Longmans, Edenburh, Great Britain, 12 ed, 1966.
- BROOKER, B. E. & FULLER, R. Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. **J. Ultrastruct. Res.**, 52: 21-31, 1975.
- BROWN, M. R. W.; ANWAR, H. & LAMBERT, P. A. Evidence that mucoid **Pseudomonas aeruginosa** in the cystic fibrosis lung grows under iron - restricted conditions. **FEMS Microbiol. Lett.**, 21: 113-117, 1984.
- BUSSCHER, H. J. & WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiol. Rev.**, 46: 165-173, 1987.
- COLLEE, J. G. The nature and properties of the hemagglutinin of **Clostridium welchii**. **J. Path. Bacteriol.**, 81(2): 297-312, 1961.
- COSTERTON, J. W.; IRVIN, R. T. & CHENG, K. J. The bacterial glycocalix in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, 35: 299-324, 1981.a.

- COSTERTON, J. W.; IRVIN, R. T. & CHENG, K. J. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. **CRC Critical Rev. Microbiol.**, **8(4)**: 303-338, 1981.b.
- DILLON, J. K.; FUERST, J. A.; HAYWARD, A. C. & DAVIS, G. H. E. A comparasion of five methods for assaying bacterial hidrophobicity. **J. Microbiol. Methods**, **6**: 13-19, 1986.
- DISHE, F. E. & ELEK, S. D. Experimental food poisoning by **Clostridium welchii**. **Lancet**, **2**: 71, 1957.
- DUBOIS, M.; GILLIES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analyt. Chemist.**, **28**: 350-356, 1956.
- DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S. & CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in **Salmonellae**. **J. Path. Bacteriol.**, **92**: 107-138, 1966.
- DUGUID, J. P. & OLD, D. C. Adhesive properties of **Enterobacteriaceae**. In **Bacterial Adherence** (Beachey, E. H., ed.) Receptors and Recognition Series B, Vol. 6, p. 186, Chapman e Hall, London, 1980.
- DUNCAN, C. L.; STRONG, D. H. & SEBALD, M. Sporulation and enterotoxin production by mutants of **Clostridium perfringens**. **J. Bacteriol.**, **110(1)**: 378-391, 1972.

ELLEN, R. P. & GIBBONS, R. J. M-protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect. Immun.*, 5(5): 826-830, 1972.

ESPERSEN, F. & CLEMMENSEN, I. Isolation of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 37: 526-531, 1982.

FULLER, R. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cell. *J. Gen. Microbiol.*, 87: 245-250, 1975.

GATTI, M. S. V., SERAFIM, M. B., PESTANA DE CASTRO, A. F. & MONTEIRO, A. R. Stability of thermolabile (LT) enterotoxin produced from enterotoxigenic *Escherichia coli* strains maintained in vitro. *Med. Microbiol. Immunol.*, 175: 55-60, 1986.

GREGORY, E. M. & FANNING, D. D. Effect of heme on *Bacteroides distosomus* catalase and aerotolerance. *J. Bacteriol.*, 156: 1012-1018, 1983.

GUINAN, M.; SCHABERG, D.; BRUHN, F. W. ; RICHARDSON, C. J. & FOX, W. W. Epidemic occurrence of neonatal necrotizing enterocolitis. *Am. J. Dis. Child.*, 133: 594-597, 1979.



- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analyt. Biochem.**, **48**: 422-427, 1972.
- HONDA, T.; KHAN, M. M. A.; TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. Grouping of enterotoxigenic *Escherichia coli* by hidrophobicity and its relation to hemagglutination and enterotoxin productions. **FEMS Microbiol. Lett.**, **17**: 273-276, 1983.
- JACQUES, M. & FOIRY, B. Electron microscopic visualization of capsular material of *Pasteurella multocida* types A and D labeled with polycationic ferritin. **J. Bacteriol.**, **169**(8): 3470-3472, 1987.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**, Ed. Guanabara Koogan, 10<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro, 1974.
- JONES, G. W. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In **Microbial Interactions** (Reissig, J. L., ed.) Receptor and Recognition Series B, Vol. 6, p. 141, Chapman and Hall, London, 1977.
- JONES, G. W. & ISAACSON, R. E. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. **Crit. Rev. Microbiol.**, **10**: 229-260, 1983.

- JONSON, G.; SVENNERHOLM, A. & HOLMGREN, J. *Vibrio cholerae* express cell surface antigens during intestinal infection which are not expressed during in vitro culture. *Infect. Immun.*, 57(6): 1809-1815, 1989.
- JURGENSEN, C. A. & JURGENSEN, L. D. Passivação do cobre, alternativa para obtenção da condição de anaerobiose. *Rev. Bras. Pat. Clin.*, 18(3): 58-63, 1982.
- KLIEGMAN, R. M. Neonatal necrotizing enterocolitis: implications for an infectious disease. *Ped. Clin. North. Am.*, 26(2): 327-344, 1979.
- KLIEGMAN, R. M. The role of clostridia in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. In *Clostridia in Gastrointestinal Disease*. (Borriello, S. P., ed.), Cap. 4, CRC Press, Boca Rotan, Florida, p. 67, 1985.
- KUBO, M. & WATASE, H. Electron microscopy of *Clostridium perfringens* in the intestine of neonatal pigs with necrotic enteritis. *Jap. J. Vet. Sci.*, 47(3): 497-501, 1985.
- KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams e Wilkins, Baltimore, London, Vol. 1, Section 6, p. 602, 1984.

- LAM, C.; TURNOWSKY, F.; SCHWARZINGER, E. & NERUDA, W. Bacteria recovered without sub-culture from infected human urines expressed iron-regulated outer membranes proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, **24**: 255-259, 1984.
- LEITE, D. S., YANO, T. & PESTANA DE CASTRO, A. F. Production, purification and partial characterization of a new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.**, **139**: 295-306, 1988.
- LILJEMARK, W. F. & GIBBONS, R. J. Proportional distribution and relative adherence of *Streptococcus mitis* on various surfaces in the human oral cavity. **Infect. Immun.**, **6**: 852-859, 1972.
- LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, J. R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**, 5ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 345, 1977.
- LU, Y-S.; AFENDIS, S. J. & PAKES, S. P. Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* 3: A in rabbits. **Infect. Immun.**, **56(6)**: 1532-1537, 1988.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Bioph. Biochem. Cytol.**, **9**: 409-414, 1961.

- LUFT, J. H. Ruthenium Red. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**: 347-415, 1971.
- MACKIE, E. B.; BROWN, K. N.; LAM, J. & COSTERTON, J. W. Morphological stabilization of capsules of group B streptococci, types Ia, Ib, II and III, with specific antibody. *J. Bacteriol.*, **138**(2): 609-617, 1979.
- MARKHAM, J. L.; KNOX, K. W.; WICKEN, A. J. & HEWETT, M. J. Formation of extracellular lipoteichoic acid by oral streptococci and lactobacilli. *Infect. Immun.*, **12**(2): 378-386, 1975.
- McKEE, A. S.; McDERMID, A. S.; BASKERVILLE, A.; BARRY DOWSETT, A.; ELLWOOD, D. C. & MARSH, P. D. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infect. Immun.*, **52**(2): 349-355, 1986.
- McKEDOWN-LONGO, P. J. Fibronectin-cell surface interactions. *Rev. Infect. Dis.*, **9-Supl. 4**: S322-S332, 1987.
- MOWRY, R. W. & McMANUS, I. F. A. *Staining methods. Histological and histochemical.* A Holber International Reprint, 12 ed., p. 362-364, 1964.

- OLUBUNMI, P. A. & TAYLOR, D. J. *Clostridium perfringens* type A in enteric diseases of pig. *Tropical Veterinarian*, 3(1/4): 28-33, 1985.
- OTTOW, J. C. G. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29: 79-108, 1975.
- PEACHEY, L. D. Thin sections. I. A study of sections thickness and physical distortion produced during microtomy. *J. Biophys. Biochem. Citol.*, 4: 233, 1958.
- ROESEL, C. E. *Imunologia: um método auto-instrutivo*. McGraw do Brasil, São Paulo, p. 114, 1981.
- SAKAGUSHI, G.; UEMURA, T. & RIEMANN, H. P. Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, 26: 762-767, 1973.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M. & TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.*, 45(2): 534-536, 1984.
- SCOTT, V. N. & DUNCAN, C. L. Affinity chromatography purification of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.*, 12(3): 536-543, 1975.

- SEVERIN, W. P. J.; La FUENTE, A. A. & STRINGER, M. F.  
**Clostridium perfringens** type C causing necrotising enteritis. **J. Clin. Pathol.**, **37**: 942-944, 1984.
- SIMPSON, W. A.; COURTNEY, H. S. & OFEK, I. Interactions of fibronectin with streptococci: the role of fibronectin as a receptor for **Streptococcus pyogenes**. **Rev. Infect. Dis.**, **9 Supl. 4**: S351-S359, 1987.
- SIMS, L. D.; TZIPORI, S.; HAZARD, G. H. & CARROL, C. L. Haemorrhagic necrotizing enteritis in foals associated with **Clostridium perfringens**. **Austr. Vet. J.**, **62(2)**: 194-196, 1985.
- SKJELKVALE, R. & UEMURA, T. Experimental diarrhoea in human volunteers following oral administration of **Clostridium perfringens** enterotoxin. **J. Appl. Bacteriol.**, **43**: 281, 1977.
- SNIPES, K. P.; HANSEN, L. M. & HIRSH, D. C. Plasma and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by **Pasteurella multocida**. **Am. J. Vet. Res.**, **49(8)**: 1336-1338, 1988.
- STARK, R. L. & DUNCAN, C. L. Purification and biochemical properties of **Clostridium perfringens** type A enterotoxin. **Infect. Immun.**, **6(3)**: 662-673, 1972.

- STRINGER, M. F. *Clostridium perfringens* type A food poisoning. In *Clostridia in gastrointestinal Disease*. (Borriello, S. P., ed.) Cap. 6., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 117, 1985.
- SWANSON, J. Gonococcal adherence: selected topics. *Rev. Infect. Dis.*, 5: S678-S684, 1983.
- TETI, G.; CHIAFALO, M. S.; TOMASELLO, F.; FARA, C. & MASTROENI, P. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* adherence to uroepithelial cells by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.*, 55(3): 839-842, 1987.
- TRUSCOTT, W. M. & HIRSH, D. C. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocyte activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. *Infect. Immun.*, 56(6): 1538-1544, 1988.
- TUOMANEN, E. & WEISS, A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 152: 118-125, 1985.
- UEMURA, T. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* on solidified sporulation media. *J. Food. Hyg. Soc.*, 19(5): 462-467, 1978.

- UEMURA, T. & HAMASAKI, Y. Influence of carbohydrates on "in vitro" production of enterotoxin by food poisoning strains of *Clostridium perfringens*. *J. Food. Hyg. Soc.*, 20(1): 33-40, 1979.
- VENABLE, J. H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 25: 407-408, 1965.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 4(4): 475-478, 1958.
- WEIGEL, J. & DYKSTRA, M. *Clostridium thermocellum*: adhesion and sporulation while adhered to cellulose and hemicellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 59-65, 1984.
- YAMAGISHI, T.; GYOBRE, Y.; SAKAMOTO, K.; ISHISAKA, S.; SAITO, K.; MORINAGA, S.; KATSUDA, S.; UMEI, T. & KONISHI, T. Response of ligated rabbit ileal loop to *Clostridium perfringens* type C strains. *Microbiol. Immunol.*, 31(9): 859-868, 1987.
- YANAGAWA, R.; OTSUKI, K. & TOKUI, T. Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jap. J. Vet. Res.*, 16: 31-38, 1968.



YANAGAWA, R. & HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infect. Immun.*, 13(4): 1293-1295, 1976.