

## ESTUDO IMUNOLÓGICO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO **CHROMOBACTERIUM** ATRAVÉS DOS TESTES DE AGLUTINAÇÃO EM LÂMINAS E DE IMUNODIFUSÃO EM GEL \*

CLEÔMENES REIS \*\* — WILLIAN FERREIRA AIRES \*\*\*.

### RESUMO

Segundo referências bibliográficas, as bactérias do gênero *Chromobacterium* exibem considerável heterogeneidade antigênica, e que os antígenos somáticos das amostras mesofílicas e psicofílicas parecem completamente distintos.

Tendo sido isolada uma nova amostra mesofílica, recentemente, em nosso meio, fez-se o estudo imunológico comparativo entre ela e as amostras mesofílicas provenientes do Instituto Pasteur de Paris e Public Health Service, Atlanta, Georgia, U.S.A. e uma amostra psicofílica proveniente do Instituto Pasteur de Paris.

Houve, nos testes de aglutinação em lâmina, reações cruzadas entre todas as amostras estudadas.

Nos testes de imunodifusão em gel de agar, pelo método de Ouchterlony, observou-se que a amostra isolada recentemente em Goiás exibe um antígeno diferente daqueles existentes nas demais amostras.

### INTRODUÇÃO

A estrutura antigênica de *Chro-*

*mobacterium* tem merecido poucas citações bibliográficas, acreditamos que talvez seja devido ao fato de ocorrências muito raras de lesões humanas fatais terem sido relatadas, sendo assim colocado em plano secundário os estudos sobre estes microorganismos.

Wilson e Miles<sup>5</sup>, descrevem que as amostras mesofílicas destes germes dão, muitas vezes, reações cruzadas, enquanto as psicofílicas, menos.

Estes autores citam que não existe nenhuma evidência para grupagem antigênica deles. O flagelo polar e os laterais, da mesma amostra, são antigenicamente distintos.

Sneath<sup>4</sup>, relata que os flagelos laterais, curtos e ondulados e o flagelo polar, longo e, também ondulado, são antigenicamente diferentes, numa mesma amostra, acrescentando que as culturas envelhecidas em meios líquidos

\* — Trabalho realizado no Instituto de Patologia Tropical (IPT) da Universidade Federal de Goiás — (UFGO.)

\*\* — Professor Titular do Depto de Microbiologia — IPT — UFGO.

\*\*\* — Professor Assistente do Depto. de Medicina Tropical — IPT — UFGO.



mostram poucos flagelos laterais, e que, ocasionalmente, muitas amostras não exibem flagelos laterais.

Realizando a separação de substâncias das células de *Chromobacterium*, Corpe e Salton<sup>1</sup>, observaram que frações contendo proteína, lipídeos e carboidratos reagiram antígenicamente com todas as células do antisoro, embora notassem aparentes diferenças físicas. A fração solúvel continha citocromo e a fração do sedimento continha duas partículas morfológicamente distintas: uma alongada e semelhante aos flagelos, e uma partícula circular com centro denso.

Após isolar e reconhecer diferenças bioquímicas marcantes da amostra obtida em Goiás frente as demais, que são registradas na Literatura, pretendemos verificar se havia também, diferenças imunológicas entre elas.

#### MATERIAL E MÉTODOS

As seguintes amostras bacterianas (*Chromobacterium*) foram utilizadas:

- a — *Chromobacterium violaceum* — Proveniente do Instituto Pasteur de Paris
- b — *Chromobacterium violaceum* KC 531 — Proveniente do P.H.S. de Atlanta, Geogia, U.S.A.
- c — *Chromobacterium lividum* — Proveniente do Instituto Pasteur de Paris, a única amostra psicrófila da experiência.
- d — *Chromobacterium goiense* (ATCC 29 094)

#### A — Preparação do antígeno:

Colonias de 72 horas, crescidas em agar simples inclinado (tubos contendo 20 ml. de meio) foram removidas para outros tubos contendo 2 ml. de salina 0,85%, estéril, com auxílio de alça de platina, e submetidos 6 vezes consecutivas a congelamento a -15°C e descongelamento em temperatura ambiente, com intervalos de 20 minutos.

Logo após, foram feitos repiques para observar a esterilidade do material assim obtido. Depois, procedeu-se à concentração e liofilização em aparelho Virtis, da Research Equipment — Gardiner, N. York, U.S.A.

#### B — Preparação do anticorpo:

O soro foi obtido 45 dias depois da primeira inoculação, sendo o antígeno injetado com adjuvante de Freund completo.

#### C — Aglutinação:

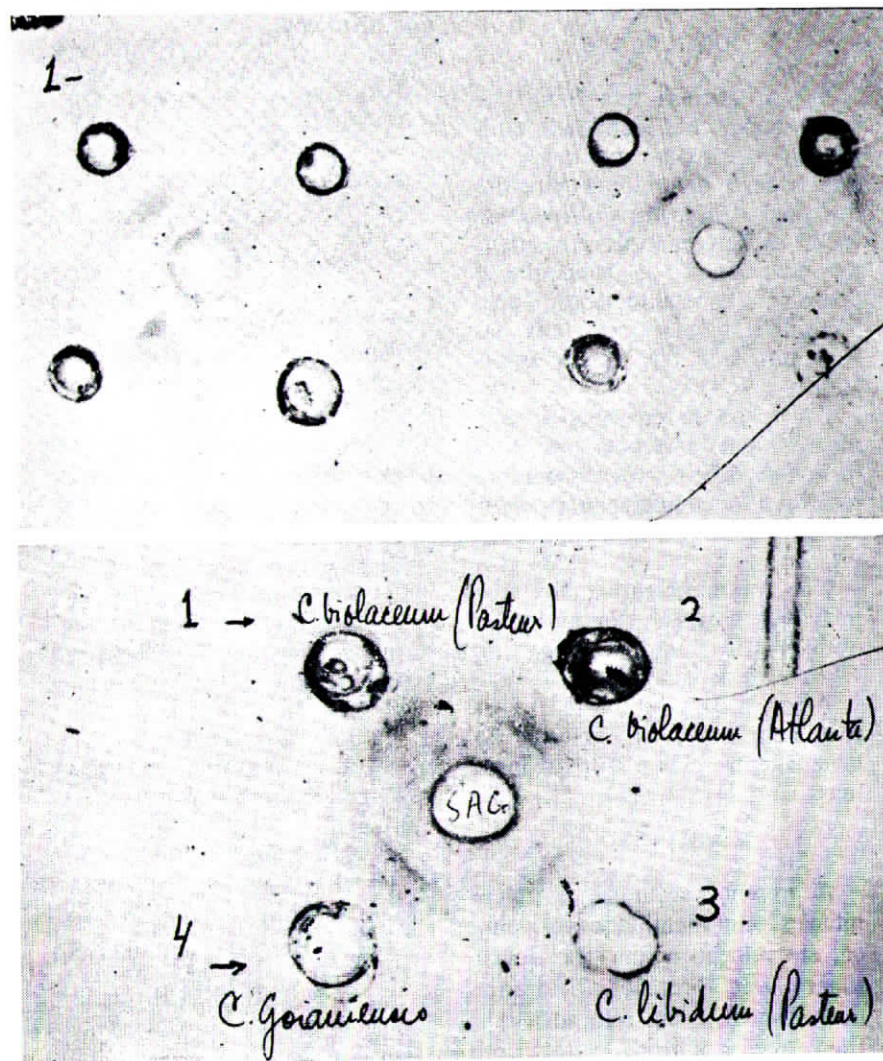
Uma alça de platina de cultura em meio líquido (tioglicolato de sódio, de Brewer) de 72 horas, mais uma gota de soro e uma gota de salina fisiológica. Fazendo-se a leitura 15 minutos após, com o auxílio de lupa.

#### D — Difusão em Gel:

Foram feitas lâminas com gel de agar a 2%, em solução salina fisiológica e azida sodica, segundo Ouchterlony<sup>2</sup>.

Figura 1 — Resultados observados entre as amostras de *Chromobacterium* estudadas através da imunodifusão em Gel, pelo método de Ouchterlony:

#### Observação das provas de imunodifusão de *Chromobacterium*



- 1 — Ag = *C. violaceum* Atlanta
  - 2 — Ag = *C. lividum* I. Pasteur
  - 3 — Ag = *C. violaceum* I. Pasteur
  - 4 — Ag = *C. violaceum* Goiás
- Centro Ac = *C. violaceum* Goiás

Observam-se nova linha de precipitação para a amostra Goiás



A leitura foi feita 72 horas depois, em que o anticorpo era colocado no centro e os antígenos em quatro orifícios em torno.

#### RESULTADOS

Foram obtidas três linhas de precipitação com identidade antigênica, nas quatro amostras, em que o soro de animais inoculados com a amostra goiana estava no orifício central. No entanto, uma linha de precipitação aparecia constantemente, sem identidade, com relação aos outros antígenos das outras amostras.

Em razão da presença do pigmento bacteriano nos antígenos, tornou-se difícil, em nosso laboratório a documentação fotográfica das referidas linhas de precipitação.

Não foram feitos estudos com relação à natureza dos antígenos obtidos dos vários tipos de *Chromobacterium*.

A prova de aglutinação é positiva, com todas as bactérias do genero, entre elas e entre si mesmas.

#### DISCUSSÃO

A presença de linhas de precipitação sem identidade antigênica, em relação a amostra Goiás, sugere uma diferença, pelo menos antigênica, em relação à outras espécies e tipos.

Como os antígenos flagelares e polares, assim como os do corpo bacteriano, são completamente distintos, numa mesma bactéria, as linhas de precipitação com identidade antigênica devem ser

oriundas do fato de possuírem a mesma natureza química.

A aglutinação positiva entre elas e entre si mesmas deve ocorrer por conta destes antígenos idênticos.

#### IMMUNOLOGICAL STUDIES OF CHROMOBACTERIUM SPECIES BY IMMUNODIFFUSION AND AGGLUTINATION METHODS

The immunological studies by immunodiffusion method demonstrated antigenic specificity of mesophylic strain discovered in Goiás, Brazil (*Chromobacterium goianiensis*), comparatively with others *Chromobacterium* strains (*Chromobacterium violaceum* — KC 531, Public Health Service, Atlanta, U.S.A.; and 54.144, Pasteur Institute, Paris, France: *Chromobacterium lividum*, 52.227, Pasteur Institute, Paris, France).

On the basis of the findings obtained in agglutination slide tests were development of cross reaction, and it dont be considered as one of the special techniques available.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORPE, W.A. & SALTON, M.R.J. — from cells of *Chromobacterium violaceum*. Properties of surface materials released. *Biochem. adn Biophys. Acta*, 124: 125-135, 1966.
- OLIVEIRA LIMA, A. & DIAS DA SILVA, W. — *Imunologia. Imunopatologia. Alergia. Métodos*. Guanabara Koogan. 1a. Ed. 74-75, 1970.
- REIS, C.; PEREIRA, E.; CAETANO SOUZA, O.; DINIZ, M.; MUNIZ, M. A. & KOLEILAT M.N.M. — Isolamento de possível nova espécie de *Chromobacterium* de águas poluídas, em Goiás. *Rev. Pat. Trop.* 2: 283-287, 1966.
- SNEATH, P.H.A. — Identification methods applied to *Chromobacterium*. In *Identification methods for bacteriologists*, Gibbs, B.M. & Skinner, F.A. ed. Part. A. Academic Press., 4th. edit. 15-20, 1966.
- WILSON, G.S. & MILES, A.A. — *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*. Edward Arnold 1966.