

## DIFERENÇAS ANTIGÊNICAS DE CLONES DE *Moraxella bovis*<sup>1</sup>

RENATA COSTA SCHRAMM<sup>2</sup> e FRUTUOSO LUIZ DE ARAÚJO<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Schramm R.C. & Araújo F.L. 1994. [Antigenic differences of clones of *Moraxella bovis*.] Diferenças antigênicas de clones de *Moraxella bovis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(2/3): 75-78. Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel, 96100-000 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Some antigenic differences of clones of *Moraxella bovis* recovered from a 6 months old bullock with infectious keratoconjunctivitis were studied through different techniques. The clones were classified biochemically by standard procedures. Seven polyclonal sera were produced in rabbits and tested against 12 clones by double immunodiffusion. Six monoclonal antibodies produced against *M. bovis* GF9 were used to quantify titles contained in five clones through the hemagglutination inhibition technique. Six clones were used in an ELISA with the panel of monoclonal antibodies. Immunodiffusion detected that only one clone was different from the others, while hemagglutination showed that the five clones studied were different. ELISA showed no clear cut differences among the clones. It can be concluded that the *M. bovis* population present in the animal studied is antigenically heterogeneous and that the hemagglutination inhibition technique may detect these differences.

**INDEX TERMS:** Antigenicity, clones, *Moraxella bovis*.

**SINOPSE.-** Foram estudadas diferenças antigênicas de clones de *Moraxella bovis* recuperados de um terneiro com 6 meses de idade, acometido pela primeira vez de ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Sete soros policlonais produzidos em coelhos foram testados contra 12 clones por imunodifusão dupla. Seis anticorpos monoclonais produzidos a partir da amostra GF9 de *M. bovis* foram usados para verificar títulos de cinco clones através da técnica da inibição da hemoaglutinação. O teste ELISA foi utilizado para detectar reações de seis clones. Através da imunodifusão verificou-se que apenas um clone foi diferente dos outros. Contudo, pela técnica de inibição da hemoaglutinação observou-se que os cinco clones estudados eram diferentes. O teste ELISA não demonstrou diferenças claras entre os clones. Pode-se concluir que a população de *M. bovis* presente no globo ocular do animal estudado é antigenicamente heterogênea.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Antigenicidade, clones, *Moraxella bovis*.

### INTRODUÇÃO

Considerando a existência de diferenças antigênicas entre distintas cepas de *Moraxella bovis* sugerida por Baptista (1979), Pugh et al. (1976) e Pugh et al. (1978) e, em consequência o inconstante comportamento das vacinas na imunização dos bovinos, há a necessidade de se salientar esse fato quando se pretende o controle imunitário da ceratoconjuntivite infecciosa.

Pugh et al. (1971) sugeriram a utilização do teste de imunodifusão radial para estudos sorológicos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina e para identificação e análise antigênica de *M. bovis*. Essa técnica, usando soros adsorvidos e não adsorvidos é considerada suficientemente sensível para o estudo de relações antigênicas entre cepas de uma bactéria, sendo capaz de detectar concentrações de antígenos de até 1µl/ml (Crowle 1973). Gil Turnes & Araújo (1982) utilizaram a técnica de imunodifusão dupla para estudar as características antigênicas de 12 amostras de *M. bovis* com soros mono-específicos, comprovando a existência de diferenças antigênicas dentro dessa espécie. Albuquerque (1982) estudou 28 amostras de *M. bovis* isoladas de olhos de 4 bovinos com ceratoconjuntivite infecciosa de um rebanho amostrado mensalmente durante 5 meses, comprovando, através da técnica de imunodifusão dupla, a existência de variações nos sorotipos da bactéria prevalente e em amostras recuperadas de um mesmo animal em diferentes coletas e isolou mais de um sorotipo de *M. bovis* de animais acometidos da enfermidade no mesmo rebanho.

Lepper & Hermans (1986) utilizaram o teste ELISA para caracterizar e quantificar antígenos de fimbrias de cepas de *M. bovis* separando-as em seis sorogrupos. Uma cepa dos Estados Unidos mostrou-se homóloga a uma cepa australiana, sugerindo a existência de determinantes antigênicos comuns.

A capacidade de aglutinar hemácias de galinha foi detectada em cepas muito fimbriadas de *M. bovis*. Amostras pouco fimbriadas também aglutinaram eritrócitos, mas com títulos consideravelmente menores. Cepas não fimbriadas

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 15 de abril de 1994.

Parte da tese de Mestrado do primeiro autor, realizada na Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Departamento de Veterinária Preventiva, Fac. Veterinária, UFPel, 96100-000 Pelotas, RS.

<sup>3</sup> Laboratório de Doenças Infecciosas, UFPel.

não hemaglutinaram. Antisoro produzido em coelhos inibiu a adesão de cepa fimbriada, sendo maior a inibição de amostra homóloga do que heteróloga, também com fímbricas (Annuar & Wilcox 1985).

As diferenças de proteção por vacinas frente a agressão por cepas homólogas e heterólogas e a existência de variações nos sorotipos de *M. bovis* de animais doentes num surto ou em diferentes regiões permitem formular a hipótese de que existem variações antigênicas entre isolamentos de *M. bovis* no globo ocular de um bovino. Este estudo teve com objetivo avaliar as características antigênicas de isolamentos de *M. bovis* coletados de um animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e isolamento

*Moraxella bovis* foi obtida de um animal com 6 meses de idade, raça Hereford, acometido pela primeira vez de ceratoconjuntivite infecciosa bovina e com quadro clínico inicial da doença, em fase de lacrimajamento abundante e congestão vascular. Coletou-se amostra diretamente do globo ocular, sob a terceira pálpebra, com cotonete estéril, sendo imediatamente semeada em meio de ágar sangue desfibrinado de ovino a 8%, distribuído em placa de Petri. A placa, no laboratório, foi incubada a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano selecionaram-se colônias translúcidas e hemolíticas, que foram clonadas, semeadas em ágar sangue desfibrinado de ovino a 8%. As placas, devidamente identificadas, foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente os isolamentos foram submetidos a provas bioquímicas para identificação e liofilizados para manutenção.

Os clones de *M. bovis*, identificados com R1, R2, R3, R4, R5, R6 e R7 eram diplococos Gram negativos, autoaglutinantes em salina, positivos para oxidase e catalase, não produtores de indol e ácido sulfídrico, imóveis, não redutores de nitrito a nitrito, não oxidadores de glicose, maltose, galactose, lactose e sacarose, negativos para citrato, sem crescimento em ágar MacConkey.

### Hiperimunização de coelhos

Para a produção de antígenos suspenderam-se culturas de 24 horas a 37°C dos isolamentos R1, R2, R3, R4, R5, R6 e R7 em 2 ml de solução de NaCl 0,15M (salina), com alça de platina, em condições de assepsia, até atingir turbidez equivalente ao tubo nº 3 na escala de MacFarland. Adicionou-se 0,03 ml de solução de formaldeído (Araújo 1980). Os antígenos foram inoculados por via endovenosa em coelhos (Araújo 1980). Após uma semana da última inoculação fez-se sangria total, sendo o sangue colhido em tubos de ensaio estéreis. Os soros hiperimunes, identificados como 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, correspondem, respectivamente, aos clones que lhes deram origem (R1, R2, R3, R4, R5, R6 e R7), sendo fracionados em frascos estéreis e congelados a 20°C abaixo de zero.

### Imunodifusão dupla

O meio utilizado para imunodifusão dupla foi ágar

Noble 1%<sup>4</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06%<sup>5</sup>, H<sub>2</sub>O q.s.p. 100ml, mertiolato 0,01%<sup>6</sup>, pH 7,6. A prova de imunodifusão dupla foi baseada nos trabalhos de Ouchterlony (1948) modificada por Pugh et al. (1971). Produziram-se antígenos para o teste de imunodifusão. De acordo com Pugh et al. (1971) culturas puras de *M. bovis* foram semeadas em três placas de ágar sangue desfibrinado de ovino a 8%, incubando-se por 24 horas a 37°C. As culturas das três placas foram suspensas em 1 ml de água destilada estéril, sendo imediatamente congeladas a 25°C abaixo de zero e descongeladas rapidamente, repetindo-se o congelamento e descongelamento por três vezes sucessivas. Centrifugou-se por 15 minutos a 1.000 rpm e adicionou-se mertiolato a 0,01% ao sobrenadante. Os antígenos foram conservados em refrigeração a 4°C. Consideraram-se positivas as reações de precipitação que formaram bandas nítidas entre os orifícios que continham antígenos e soros homólogos e heterólogos.

### Ensaio imunoenzimático

Em experimentos de fusão celular Barbosa (1989) estabeleceu seis linhagens de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície de *M. bovis* cepa GP9. Esses anticorpos monoclonais foram identificados através do teste ELISA como 47D, 410D, 35F, 36E, 311B e 52E e testados com os clones R1, R2, R3, R4, R5 e R7 pelo teste ELISA.

As células de *M. bovis* foram suspensas em tampão carbonato (0,1 M, pH 9,5) em concentração equivalente ao tubo nº 3 na escala de MacFarland. A seguir adicionaram-se 50µl da suspensão às cavidades das microplacas e deixou-se durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte lavou-se a placa três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e adicionou-se 0,15 ml de PBS contendo 1% de albumina bovina. Após 30 minutos a solução bloqueadora foi retirada, adicionando-se 50µl dos anticorpos monoclonais diluídos 1:50 em PBST e deixou-se reagir por 4 horas a temperatura ambiente. Soros de camundongos normais e imunizados com *M. bovis* diluídos 1:50 em PBST foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Posteriormente lavou-se a placa 3 vezes com PBST, adicionando-se 50µl de conjugado composto de anticorpos de coelho anti-imunoglobulinas de camundongo ligado a peroxidase, deixando-se reagir por 3 horas a temperatura ambiente. A presença de anticorpos foi revelada pela adição de substrato para enzima.

### Inibição da hemoaglutinação

Prepararam-se diluições base dois, em salina, dos soros produzidos em coelhos e de seis anticorpos monoclonais (Barbosa 1989). A 50µl de cada diluição adicionou-se 1 UHA (uma unidade hemoaglutinante) do antígeno em estudo. As microplacas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, então, acrescentaram-se 50µl de

<sup>4</sup>Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, USA.

<sup>5</sup>Merck, Darmstadt, Alemanha.

<sup>6</sup>Lilly & Co., Indianapolis, USA.

suspensão de hemácias a 1%. A leitura foi feita após 90 minutos a 4°C.

## RESULTADOS

**Imunodifusão dupla.** A técnica de imunodifusão dupla utilizando os isolamentos de *Moraxella bovis* frente aos soros permitiu comprovar uma ou mais bandas de precipitação. O clone R2 não reagiu com o soro 6.

**Teste ELISA.** Os anticorpos monoclonais reagiram com todos os clones de *M. bovis* testados, revelando um certo

Quadro 1. Reatividade dos anticorpos monoclonais com isolamentos de *Moraxella bovis* em um teste ELISA

Anticorpo monoclonal		Antígeno					
		R1	R2	R3	R4	R5	R7
47	D	+++ <sup>a</sup>	+++	+++	+++	+++	+++
410	D	+	+	+	+	++	++
35	F	+++	+++	+++	+++	+++	+++
36	E	+++	+++	+++	+++	++	++
311	B	+++	+++	+++	+++	++	++
52	E	+++	+++	+++	+++	+++	+++

<sup>a</sup>+++ Reação forte, ++ reação média, + reação fraca.

grau de homogeneidade antigênica entre as amostras testadas (Quadro 1). O anticorpo monoclonal 410D reagiu fracamente com os clones, indicando uma diferença sorológica.

**Inibição da hemoaglutinação.** Observaram-se variações de títulos inibidores da hemoaglutinação entre os antígenos testados (Quadro 2). O anticorpo monoclonal 47D inibiu a hemoaglutinação pelo clone R4. O anticorpo monoclonal 36E inibiu a hemoaglutinação pelo clone R3. Nenhum anticorpo monoclonal inibiu a hemoaglutinação pelo clone R2. Todos anticorpos monoclonais foram capazes de inibir a hemoaglutinação pelos isolamentos R1 e R7. Os anticorpos monoclonais utilizados na técnica de ELISA são os mesmos usados na HI.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Bacterinas de *Moraxella bovis* contendo antígenos enzimáticos e fimbriais protegeram bovinos contra ceratoconjuntivite infecciosa quando desafiados experimentalmente com culturas homólogas e heterólogas (Reyes 1987, Gerber et al. 1988). Entretanto, há fatores limitantes ao

sucesso da imunoprofilaxia, ocorrendo diferenças de proteção por vacinas frente a agressão por cepas homólogas e heterólogas (Pugh et al. 1978).

Nossos resultados, empregando a técnica de imunodifusão dupla, demonstraram que soros homólogos e heterólogos testados com antígenos produziram uma banda de precipitação comum à maioria dos isolamentos, destacando-se o antígeno R2, que frente ao soro 6 não produziu banda, sugerindo uma diferença antigênica. Esses resultados concordam com os trabalhos de Gil Turnes & Araújo (1982), Albuquerque (1982) e Saldanha (1983), que utilizaram a adsorção de soros e detectaram heterogeneidade antigênica de amostras de *M. bovis*. Conclui-se que em isolamentos de um globo ocular e em isolamentos de diferentes bovinos detectam-se diferenças antigênicas.

A utilização do teste ELISA para avaliar diferenças entre clones de *M. bovis* isolados do globo ocular bovino revelou um certo grau de homogeneidade entre as amostras testadas. Barbosa (1989) observou resultados semelhantes comparando os mesmos anticorpos monoclonais em um teste ELISA com isolamentos de *M. bovis* de uma região do estado do Rio Grande do Sul, mas notou que a composição antigênica das cepas dos Estados Unidos era diferente das cepas de outras regiões, confirmando resultados obtidos com anticorpos monoclonais com cepas isoladas no Uruguai (Cobo et al. 1984), Austrália (Lepper & Hermans 1986) e Grã-Bretanha (Moore & Rutter 1987).

Anticorpos monoclonais têm sido usados para a caracterização sorológica de microrganismos em substituição aos soros policlonais convencionais (Waltman et al. 1988). Dos clones de *M. bovis* estudados com anticorpos monoclonais foi possível observar que dois possuíam a mesma constituição antigênica, pois reagiram com todos os anticorpos. Dois isolamentos apresentaram um antígeno em comum e o clone R2 não reagiu com os anticorpos monoclonais testados. Esses dados demonstraram que a população de *M. bovis* presente no globo ocular de um animal pode ser antigenicamente heterogênea.

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese testada, detectando-se diferenças antigênicas entre clones de *M. bovis*. Salienta-se que as técnicas de hemoaglutinação e ELISA quando se usam anticorpos monoclonais mostraram-se eficazes e de grande valia para demonstrar as diferenças entre clones isolados do globo ocular do bovino. Esses dados devem ser levados em consideração quanto à utilização das técnicas e especialmente na evidência sugerida pelos resultados, os quais mostram que bovinos infectados pela primeira vez podem apresentar clones distintos, dificultando a imunoprofilaxia à ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque I.M.B. 1982. Estudo sorológico de cepas de *Moraxella bovis* isoladas de um surto de queratoconjuntivite infecciosa bovina. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 33 p.
- Arruar B.O. & Wilcox G.E. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. Res. Vet. Sci. 39:241-246.

Quadro 2. Título de inibição da hemoaglutinação

Anticorpo monoclonal	GF9	Antígeno					
		R1	R2	R3	R4	R7	
47 D	16	8	0	0	4	32	
410 D	16	8	0	0	0	32	
35 F	2	8	0	0	0	16	
36 E	2	8	0	4	0	32	
311 B	8	64	0	0	0	8	
52 E	4	4	0	0	0	8	

- Araújo F.L. 1980. Caracterização sorológica da espécie *Moraxella bovis*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 42p.
- Baptista P.J.H.P. 1979. Infectious keratoconjunctivitis: a review. Br. Vet. J. 135:225-242.
- Barbosa R.C. 1989. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra *Moraxella bovis*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 34 p.
- Cobo A.H., Leaniz G. & Gil Turnes C. 1984. Queratoconjunctivitis Infecciosa Bovina: caracterización serologica de cepas de *Moraxella bovis* aisladas en el Uruguay. Anales V Congreso Latinoamericano de Buiatria, Paysandu.
- Crowle A.J. 1973. Immunodifusion. 2nd ed. Academic Press, New York, p. 303.
- Gerber J.D., Selzer N.L., Sharpee R.L. & Beckenhauer W.H. 1988. Immunogenicity of a *Moraxella bovis* bacterin containing attachment and cornea-degrading enzyme antigens. Vet. Immunol. Immunopath. 18:41-52.
- Gil Turnes C. & Araújo F.L. 1982. Serological characterization of strains of *Moraxella bovis* using double immunodifusion. Can. J. Comp. Med. 46:165-168.
- Lepper A.W.D. & Hermans L.R. 1986. Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. Aust. Vet. J. 63:401-405.
- Moore L.J. & Rutter J.M. 1987. Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. J. Clin. Microbiol. 25:2063-2070.
- Ouchterlony O. 1948. In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. Acta. Path. Microbiol. Scand. 80:911-918.
- Pugh G.W. Jr., Hughes D.E. & Booth G.D. 1978. Serologic response of vaccinated cattle to strains of *Moraxella bovis* isolated during epizootics of keratoconjunctivitis. Am. J. Vet. Res. 39:55-57.
- Pugh G.W. Jr., Hughes D.E. & McDonald T.J. 1971. Bovine infectious kerato-conjunctivitis: Serological aspects of *Moraxella bovis* infection. Can. J. Comp. Med. 35:161-166.
- Pugh G.W. Jr., Hughes D.E., Schulz V.D. & Graham C.K. 1976. Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Resistance of vaccinated cattle to homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 37:57-60.
- Reyes J.C.S. 1987. Comparação da proteção induzida por vacinas de *Moraxella bovis* com e sem antígenos de fímbria. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 27p.
- Saldanha M.R. 1983. Estudo comparativo das técnicas de imunofluorescência indireta e imunodifusão dupla para a caracterização sorológica de isolamentos de *Moraxella bovis*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 36p.
- Waltman W.D. McDaniel L.S., Anderson B., Bland B.M., Eden C.S. & Briles D.E. 1988. Protein serotyping of *Streptococcus pneumoniae*, based on reactivity to six monoclonal antibodies. Microbiol. Path. 5:159-167.