MARCELO DE LUCA PENHA

Deteccção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase

São Paulo
2004

MARCELO DE LUCA PENHA

Deteccção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo
2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1352 FMVZ	<p>Penha, Marcelo De Luca</p> <p>Detecção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase / Marcelo De Luca Penha. - São Paulo : M. L. Penha, 2004.</p> <p>59 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.</p> <p>1. <i>Clostridium</i>. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Toxina alfa. 4. Toxina beta. 5. Toxina épsilon. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
COMISSÃO DE ÉTICA

PARECER

A Comissão de Ética desta Faculdade, analisou e aprovou o projeto de pesquisa intitulado " Detecção dos genes das toxinas alfa (α), beta (β), e épsilon (ϵ) de *Clostridium perfringens* em amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase", que será desenvolvido no Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal pelo Pós-graduando Marcelo De Luca Penha, sob orientação do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

Qualquer alteração no decurso deste projeto deverá ser comunicada a esta Comissão.

São Paulo, 16 de Abril de 2001.

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: PENHA, Marcelo De Luca

Título: Detecção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Deus

Que criou o universo e nos concedeu a vida, os sentidos e a inteligência para realizar a interminável tarefa de tentar compreendê-lo.

Aos meus Pais

Que me trouxeram a este mundo e sempre guiaram meus passos com amor, atenção, carinho, justiça e sabedoria.

À minha Família (avó Noemia, Patrícia, Ronaldo, Caio, Júlia, Valéria e Jefferson)

Que me apoia e incentiva com muito amor e carinho, mesmo não entendendo direito o conteúdo da minha pesquisa.

À Rita

Que, desde antes do início desta jornada, me acompanha com amor, carinho e dedicação incondicionais e, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre está ao meu lado acreditando, participando e torcendo por mim. Te amo muito ...

In memoriam (avós Adolpho e Francisco, avó Abigail e tia Irma)

Vocês ajudaram a plantar a semente, mas Deus os chamou antes que pudessem ver os frutos. Muito obrigado por seu carinho, inspiração e sabedoria.

É difícil expressar com palavras a intensidade dos sentimentos.

Obrigado a todos pelo amor, carinho, confiança, incentivo e paciência. Amo todos vocês ...

Esse trabalho também lhes pertence ...

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain pela atenção, paciência e dedicação. Sinto que termino o mestrado melhor do que quando comecei, tanto como ser humano quanto como profissional.

À Prof. Dra. Lucia Baldassi pelo apoio, paciência e dedicação, mesmo quando as coisas pareciam que não iam dar certo. Tenha certeza de que aprendi muito durante minha estada em seu laboratório.

À Prof. Dra. Rosa Maria Piatti pelo auxílio durante a redação do projeto de pesquisa e pelo incentivo durante todo o mestrado. Agora acho que consegui aprender algo sobre biologia molecular.

À Prof. Adriana Cortez pelo profissionalismo e auxílio técnico fundamental para execução dos protocolos de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos pelo auxílio na busca por uma bolsa de mestrado e pela preocupação constante com a situação dos pós-graduandos.

À FAPESP pelo Auxílio à Pesquisa - processo nº 02/04007-5.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof. Karen Avilez de Andrade pelo apoio técnico na parte bacteriológica da dissertação.

À Prof. Dra. Eliana Roxo pela manutenção do alto-astrol na seção, pelo empréstimo de material de laboratório e pelas dicas de formatação de texto no computador.

À Prof. Dra. Alice Akimi Ikuno pelo bom humor e pelas dicas de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Sidnei Mioshi Sakamoto pela amizade de longa data e por ter me iniciado no conhecimento das técnicas de biologia molecular.

À Prof. Dra. Solange Maria Gennari pelo incentivo constante e pela revisão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares pelas dicas de biologia molecular.

Aos funcionários da biblioteca pelo pronto atendimento durante as pesquisas bibliográficas e pela dedicação no momento da revisão bibliográfica

Aos amigos com quem convivi no Laboratório de Bacteriologia Geral - Ana Paula, André, Bianca, Fernando, Helena, Juliana, Letícia, Luana, Luciana, Martha, Michele, Paulo, Vinícius e Rodrigo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia - Alessandra, Henrique, Lara, Letície, Marcos e Nanci.

À todos os colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal e do Instituto Biológico.

Obrigado pela amizade e pelo apoio.

RESUMO

PENHA, M. L. P. **Detecção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase.** [Detection of alpha, beta and epsilon toxin genes of *Clostridium perfringens* isolated from cattle's clinical samples by polymerase chain reaction]. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

O *Clostridium perfringens* é um microrganismo anaeróbio que está presente no solo e no trato intestinal dos mamíferos. Provoca intoxicação alimentar nos seres humanos, doenças enterotoxêmicas nos animais domésticos e gangrena gasosa em ambos os grupos. O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A, B, C, D e E) mediante a produção de quatro toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota). Neste trabalho foi possível padronizar a técnica de PCR para detectar a presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de culturas de *C. perfringens*. A sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de culturas de *C. perfringens* foi de 2,27 ng/μL para o gene *cpa*, 22,7 pg/μL para o gene *cpb* e 22,7 pg/μL para o gene *etx*. A pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de 35 amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos revelou que 16 (45,7%) eram do tipo A; 18 (51,4%) eram do tipo C e 1 (2,9%) era do tipo B. Não foi observada nenhuma amostra do tipo D. A metodologia de PCR revelou-se útil na tipificação de amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos, contribuindo para o diagnóstico dessa bacteriose neste país, eliminando as dificuldades de tipificação oriundas do alto custo e da indisponibilidade de anti-soros para a tipificação pela reação de soroneutralização e evitando a utilização de animais de laboratório.

Palavras-chave: *Clostridium*. Reação em cadeia da polimerase. Toxina alfa. Toxina beta. Toxina épsilon.

ABSTRACT

PENHA, M. L. P. **Detection of alpha, beta and epsilon toxin genes of *Clostridium perfringens* isolated from cattle's clinical samples by polimerase chain reaction** [Detecção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase]. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

Clostridium perfringens is an anaerobic micro-organism that is present in the soil and gastrointestinal tract of mammals. It causes food poisoning in humans, enterotoxemic diseases in domestic animals and gas gangrene in both. *C. perfringens* is classified into five types (A, B, C, D and E) according to the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon and iota). In this trial was possible to standardize the PCR's technique to detect *cpa*, *cpb* and *etx* genes from cultures of *C. perfringens*. PCR's analytical sensibility was 2.27 ng/ μ L for *cpa* gene, 22.7 pg/ μ L for *cpb* gene and 22.7 pg/ μ L for *etx* gene. The research of *cpa*, *cpb* and *etx* genes from 35 samples of *C. perfringens* isolated from cattle reveals that 16 (45.7%) were classified as type A, 18 (51.4%) as type C and 1 (2.9%) as type B. No sample of type D was observed. PCR's technique reveals to be usefull to typify samples of *C. perfringens* isolated from cattle, contributing to diagnose of this bacterial disease in this country and solving typifying problems represented by the high costs of the process and by the lack of antiserum that is required to typify the micro-organism by seroneutralization. PCR's technique avoid the use of laboratory animals, too.

Key words: *Clostridium*. Polymerase chain reaction. Alpha toxin. Beta toxin. Epsilon toxin.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos cinco Tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i> segundo a produção das toxinas principais α , β , ϵ e ι (SMITH; HOBBS, 1974).	15
Quadro 2 - Cepas de <i>C. perfringens</i> isoladas a partir de amostras clínicas de bovinos, de acordo com a proveniência (município e estado) e material clínico empregado. São Paulo, 2004.	40
Quadro 3 - Cepas de <i>C. perfringens</i> isoladas a partir de amostras clínicas de bovinos, de acordo com a proveniência (município e estado), material clínico empregado e resultados da tipificação das cepas pela técnica de PCR. São Paulo, 2004.	43
Quadro 4 - Resultados dos testes de toxigenicidade <i>in vivo</i> com a determinação dos padrões de reatividade e da tipificação do <i>C. perfringens</i> pela técnica de PCR. São Paulo, 2004.	46

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
ϵ	épsilon
η	eta
θ	teta
ι	iota
κ	kapa
λ	lambda
μ	mu
ν	nu
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
mL	mililitro
%	porcentagem
g	grama
μL	microlitro
mg	miligrama
mM	milimolar
V	Volt
μg	micrograma
pb	pares de base
ng	nanograma
pg	picograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Tipos toxigênicos de <i>Clostridium perfringens</i>	15
1.1.1	<i>C. perfringens</i> tipo A	16
1.1.2	<i>C. perfringens</i> tipo B	17
1.1.3	<i>C. perfringens</i> tipo C	18
1.1.4	<i>C. perfringens</i> tipo D	20
1.1.5	<i>C. perfringens</i> tipo E	21
1.2	Toxinas principais	21
1.2.1	Toxina alfa (α)	22
1.2.2	Toxina beta (β)	23
1.2.3	Toxina épsilon (ϵ)	23
1.2.4	Toxina iota (ι)	24
1.3	Diagnóstico do <i>C. perfringens</i>	25
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAL	33
3.1	Cepas padrão	33
3.2	Cepas de campo	33
4	MÉTODO	34
4.1	Metodologia convencional de diagnóstico do <i>C. perfringens</i>	34
4.1.1	Cultivo das amostras de campo e padrão	34
4.1.2	Determinação da toxigenicidade das cepas de campo	35
4.2	Metodologia de diagnóstico pela técnica de PCR	36
4.2.1	Extração do DNA	36
4.2.2	Reação em cadeia pela polimerase	37

4.3	Sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de culturas puras ...	38
4.4	Pesquisa dos genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> e <i>etx</i> em cepas de <i>C. perfringens</i> isoladas de bovinos pela técnica de PCR	38
4.5	Relação entre a presença dos genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> e <i>etx</i> e os resultados obtidos pelo teste de toxigenicidade	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Isolamento de <i>C. perfringens</i> a partir de amostras clínicas de bovinos	39
5.2	Sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de cepas padrão	41
5.3	Pesquisa dos genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> e <i>etx</i> em cepas de <i>C. perfringens</i> isoladas de bovinos	41
5.4	Relação entre a presença dos genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> e <i>etx</i> e os resultados obtidos pelo teste de toxigenicidade	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Clostridium perfringens* é composta por um grupo heterogêneo de microrganismos anaeróbios, semelhantes nos aspectos bioquímicos e de cultivo, que são diferenciados pela estrutura antigênica de suas toxinas principais (BEER, 1988; NILO, 1980; SMITH, 1979).

O *C. perfringens* é um bacilo curto, com 2 a 4 µm de comprimento e 0,8 a 1,5 µm de largura, imóvel e Gram-positivo. Durante a fase de multiplicação ativa, esse microrganismo pode ser visualizado em grupos de duas ou quatro células (BEER, 1988; SMITH; WILLIANS, 1984). Apresenta esporos subterminais ovais, raramente verificados em amostras coletadas de lesões ou nos meios de cultivo bacteriológico (SWARTZ, 1990). A maior parte das cepas do *C. perfringens* apresenta cápsula, que é demonstrada pelo exame do fluído peritoneal de camundongos inoculados com cultivos na fase de multiplicação ativa. Tolerância a presença de oxigênio e é provavelmente o microrganismo com a mais rápida taxa de multiplicação conhecida (ROOD, 1998; SMITH; WILLIANS, 1984). Cresce bem no meio de ágar-sangue produzindo colônias pequenas, com diâmetro entre 1 a 3 mm, pouco convexas, semi-opacas, lisas e brilhantes. Essas colônias geralmente estão circundadas por uma zona estreita de hemólise total causada pela toxina teta e por uma zona mais larga de hemólise parcial produzida pela toxina alfa. No meio de gema de ovo, as colônias medem de 3 a 8 mm de diâmetro e são salientes, lisas, amareladas e circundadas por uma zona de opalescimento provocada pela ação da toxina alfa sobre a lecitina do meio. O *C. perfringens* fermenta frutose, galactose, glicose, inositol, lactose, maltose, manose, amido e sucrose. Hidroliza lentamente gelatina e eventualmente caseína. Pode reduzir nitrato. Produz fermentação tumultuosa do

leite (SMITH; WILLIANS, 1984).

O *C. perfringens* está mais disseminado do que qualquer outra bactéria patogênica, Habita o solo, a matéria orgânica em decomposição e o intestino dos seres humanos e dos animais. Uma vez que este microrganismo existe no solo e é capaz de formar esporos, ele pode contaminar as superfícies expostas à poeira, tais como alimentos e peças de vestuário (ROOD, 1998; SMITH; WILLIANS, 1984; SWARTZ, 1990).

1.1 Tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens*

O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos toxigênicos (A, B, C, D e E) mediante a produção de quatro toxinas principais: alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) e iota (ι) (SMITH; HOBBS, 1974) (Quadro 1).

Tipos	Toxinas principais			
	α	β	ϵ	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Nota: + = presença.
- = ausência.

Quadro 1 - Classificação dos cinco tipos toxigênicos de *C. perfringens* segundo a produção das toxinas principais α , β , ϵ e ι (SMITH; HOBBS, 1974)

1.1.1 *C. perfringens* tipo A

O *C. perfringens* tipo A é o mais disseminado representante da espécie, sendo encontrado no intestino dos animais de sangue quente e no meio ambiente (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SMITH; WILLIAMS, 1984; TIMONEY et al., 1988). Esse tipo pode ser subdividido em duas variedades: clássica e enterotoxigênica. A variedade clássica produz a toxina- α e está associada à celulite anaeróbica, gangrena gasosa, infecções pós-traumáticas e mastite gangrenosa (HATHEWAY, 1990; NILO, 1980; PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SONGER, 1996; WALKER, 1990). A variedade enterotoxigênica produz a toxina α e também a enterotoxina, sendo responsável por enterite e intoxicação alimentar em seres humanos e diarreia em potros e suínos (NILO, 1980; PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999).

McGowan, Moulton e Rood (1958) associaram o *C. perfringens* tipo A com a enterotoxemia em cordeiros lactantes, que ocorre nos Estados Unidos durante a primavera. Os ovinos afetados apresentam depressão, anemia, icterícia, hemoglobinúria e morrem em 6 a 12 horas. Rose e Edgar (1936) e Russel (1970) descreveram uma condição similar em caprinos e em bovinos. O papel do *C. perfringens* tipo A nesta patologia é controverso uma vez que ele faz parte da microbiota normal dessas espécies e seu isolamento é uma evidência inconclusiva de que ele seja a causa da doença. Esse tipo é facilmente isolado de tecidos, efusões e do trato intestinal do cadáver logo após a morte. Como esse microrganismo é recuperado com frequência do intestino dos animais normais e cresce rapidamente nos meios de cultivo para anaeróbios, sua presença pode dificultar o isolamento de outros agentes etiológicos (WALKER, 1990). O *C. perfringens* tipo A também é responsável por casos de enterite necrótica em aves

domésticas, enterocolite necrotizante em leitões, colite em equinos e gastroenterite hemorrágica em cães (BAINS, 1968; NILO, 1980; POPOFF; JESTIN, 1985; PRESCOTT et al., 1978; SONGER, 1996).

1.1.2 *C. perfringens* tipo B

O *C. perfringens* tipo B produz as toxinas α , β e ϵ (WALKER, 1990). Timoney et al., (1988) o descreveram como agente etiológico da desinteria dos cordeiros, doença que afeta os ovinos neonatos e é prevalente nos rebanhos da África do Sul, do meio-oeste dos Estados Unidos e do Reino Unido. A infecção é adquirida da mãe ou do meio ambiente e o *C. perfringens* tipo B se multiplica no intestino, favorecido pela ingestão abundante de leite, provocando enterotoxemia acompanhada de hemorragia e ulceração do intestino delgado. A morte súbita é comum nos casos hiperagudos. Nos quadros agudos, os animais param de se alimentar e passam a apresentar fortes dores abdominais acompanhadas por diarreia sanguinolenta. Segue-se decúbito, coma e morte, geralmente em menos de 24 horas após o início dos sintomas. Esse tipo também está associado à enterite hemorrágica em bezerros, caprinos e equinos (FRANK, 1956; SONGER, 1996; STERNE; BATTY, 1975).

1.1.3 *C. perfringens* tipo C

O *C. perfringens* tipo C produz as toxinas α e β e é responsável por casos de enterite necrótica em seres humanos, aves domésticas, bovinos, cães, equinos, ovinos e suínos (BUOGO et al., 1995; MACKINNON, 1989; STERNE; BATTY, 1975; WALKER, 1990). Os animais recém-nascidos são os mais suscetíveis, talvez porque esse tipo colonize o intestino antes do estabelecimento da microbiota normal. Os animais muito jovens também apresentam um menor conteúdo enzimático em seu sistema digestivo, o que impede a inativação da toxina- β . As alterações da flora intestinal devido às mudanças súbitas na dieta dos animais também estimulam a multiplicação do *C. perfringens* tipo C (NILO, 1980; TIMONEY et al., 1988).

Os leitões são os animais domésticos mais afetados pelo *C. perfringens* tipo C e apresentam maior suscetibilidade à infecção na primeira semana de vida (BUOGO et al., 1995; FITZGERALD et al., 1988; JOHNSON et al., 1992). Nos casos hiperagudos, em leitões com até dois dias de vida, manifesta-se depressão acompanhada por diarreia e desinteria com presença de sangue e restos necróticos nas fezes (NILO, 1988; SONGER, 1996). Leitões afetados pela doença entre uma e duas semanas de vida demonstram um quadro clínico mais prolongado, com diarreia amarelada, ausência de sangue nas fezes e necrose da mucosa jejunal (FIELD; GIBSON, 1955; MACKINNON, 1989; SONGER, 1996; VANDERKOP; SUTMOLLER, 1993).

O *C. perfringens* tipo C também é o agente causador de enterite hemorrágica aguda e fatal em bezerros neonatos, cordeiros e cabras (GRINER; BRACKEN, 1953; GRINER; JOHNSON, 1954; NILO; HARRIES; JONES, 1974; SONGER, 1996). Os bezerros, geralmente fortes, saudáveis e com menos de dez dias de vida,

desenvolvem um quadro de enterite necrótica hemorrágica, enterotoxemia e dor abdominal intensa. Também podem surgir sinais neurológicos, como opistótono e tetania. Esse tipo pode ser isolado de casos entéricos não fatais de bezerros e em vacas adultas saudáveis (NILO, 1980; SONGER, 1996).

Nos ovinos jovens, o curso da infecção pelo *C. perfringens* tipo C lembra o descrito para a desinteria dos cordeiros. Nos animais adultos, porém, pode surgir um quadro de enterotoxemia hiperaguda denominado *struck*. Essa denominação deriva da morte extremamente rápida associada a essa condição, que geralmente deixa a impressão de que o animal foi atingido por um raio - *struck by lightning* (SONGER, 1996; TIMONEY et al., 1988). Nas áreas onde o *struck* é endêmico, os animais adquirem a infecção a partir dos esporos presentes no solo. A porta de entrada são lesões na mucosa gastrointestinal, geralmente provocadas por alimentos de baixa qualidade. O *C. perfringens* tipo C se multiplica no abomaso e no intestino delgado, causando necrose da mucosa, quase sempre sem sinais de diarreia ou desinteria. A evidência de toxemia pode incluir acúmulo de fluido no peritônio e na cavidade torácica (STERN; THOMSON, 1963; TIMONEY et al., 1988).

Dickie, Klinkerman e Petrie (1978) e Drolet, Higgins e Cécyre (1990) descreveram o *C. perfringens* tipo C como agente etiológico de enterite necrótica em equinos. Os sinais clínicos incluem depressão, diarreia hemorrágica severa, desidratação e, ocasionalmente, cólica (HOWARD-MARTIN et al., 1989). As lesões, localizadas no jejuno e no íleo, consistem de enterite hemorrágica aguda com necrose das vilosidades e presença de grande quantidade de bacilos Gram-positivos demonstráveis em esfregaços e cortes histológicos (SONGER, 1996).

1.1.4 *C. perfringens* tipo D

O *C. perfringens* tipo D produz as toxinas α e ϵ (STERNE; BATTY, 1975; WALKER, 1990). Apresenta-se distribuído por todo o mundo e normalmente não é um comensal intestinal (NILO, 1980). Esse tipo causa enterotoxemia em ovinos, também conhecida como morte súbita ou superingestão, afetando animais de todas as idades exceto os recém-nascidos (TIMONEY et al., 1988). Sua prevalência é maior em cordeiros de três a dez semanas, ingerindo grande quantidade de leite e habitando pastagens luxuriantes. A enterotoxemia é a principal causa de morte em cordeiros desmamados com dez semanas de vida, mantidos em confinamento e alimentados com ração rica em grãos. Essa doença, geralmente, está associada a alterações da microbiota intestinal devido à uma mudança súbita para uma dieta mais rica ou devido a uma alimentação com elevados níveis de concentrado. Surge, então, um quadro de toxemia, com enterite pouco evidente, e morte súbita. Os animais que sobrevivem por mais tempo manifestam sonolência, retração da cabeça, opistótono, convulsões e agonia seguida de morte (POPOFF, 1984).

A enterotoxemia determinada pelo *C. perfringens* tipo D também é importante em bezerros, cabras e raramente nos bovinos adultos e nos equinos (GRINER; AICHELMAN; BROWN, 1956; MUMFORD, 1961; OXER, 1956; STUBBINGS, 1990). A enterotoxemia nos bezerros lactantes é semelhante àquela descrita para os ovinos (GRINER; AICHELMAN; BROWN, 1956). Niilo (1980) considera que esse tipo pode ser isolado de amostras de bovinos *post-mortem* e do gado saudável, porém alega que a enterotoxemia aguda é rara nessa espécie. Em caprinos neonatos e adultos a presença de enterocolite catarral, fibrinosa ou hemorrágica é uma lesão consistente (BLACKWELL; BUTLER, 1992).

1.1.5 *C. perfringens* tipo E

O *C. perfringens* tipo E produz as toxinas α e ι (WALKER, 1990). Billington et al., (1998) o descrevem como agente etiológico de enterotoxemias em bezerros e cordeiros. Esse tipo não era isolado com frequência de animais, até que um surto de enterite em coelhos nos Estados Unidos forneceu evidências convincentes da sua patogenicidade. A doença caracterizou-se por diarreia profusa e morte em um período de seis horas. Sugeriu-se que fatores dietéticos foram predisponentes para a participação desse microrganismo no surto (NILO, 1980). No Brasil, a ocorrência do *C. perfringens* tipo E em bovinos é considerada inexpressiva (BALDASSI, 1998).

1.2. Toxinas principais

As cepas de *C. perfringens* produzem pelo menos 16 fatores de virulência conhecidos: as toxinas alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), eta (η), teta (θ), iota (ι), kapa (κ), lambda (λ), mu (μ) e nu (ν); neuraminidase; sialidase; enterotoxina; hemolisina não alfa-delta-teta (SMITH, 1979). As características das quatro toxinas principais (α , β , ϵ e ι), dada sua importância, são descritas a seguir.

1.2.1 Toxina alfa (α)

A toxina- α , a principal toxina letal do *C. perfringens*, é uma fosfolipase produzida, em quantidades variáveis, por todos os tipos desse microrganismo (SMITH, 1979; SONGER, 1996). Apresenta atividade citolítica, hemolítica, dermonecrótica e letal, tendo sido a primeira toxina bacteriana a demonstrar atividade enzimática (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; ROOD; COLE, 1991; SMITH, 1979). Essa toxina, com peso molecular estimado entre 30 e 106 kDa, é codificada pelo gene estrutural *cpa* localizado na região variável do cromossomo do *C. perfringens* e cuja sequência de nucleotídeos é conhecida (LESLIE et al., 1989; MCDONEL, 1980; OKABE; SHIMIZU; HAYASHI, 1989; PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; ROOD, 1998; SAINT-JOANIS; GARNIER; COLE, 1989; TITBALL et al., 1989; TSO; SIEBEL, 1989). A toxina- α é uma fosfolipase C cálcio-dependente que hidrolisa fosfolípidos e promove a desorganização da membrana celular (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SWARTZ, 1990). A hidrólise da lecitina pela toxina- α produz diacilglicerol, indutor da síntese e liberação de mediadores inflamatórios, provocando contração dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e disfunção miocárdica, que contribuem para o estabelecimento de choque profundo e morte (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). Como a lecitina está presente na membrana de muitos tipos celulares, essa toxina pode causar um dano extenso em vários tecidos (SWARTZ, 1990). A toxina- α lisa eritrócitos, plaquetas, leucócitos, células endoteliais e fibras musculares (SMITH, 1979; SONGER, 1996). Ela também hidroliza cefalina e esfingomielina, sendo considerada o fator de virulência mais importante nos quadros de gangrena gasosa (ROOD; COLE, 1991; SWARTZ, 1990).

1.2.2 Toxina beta (β)

A toxina- β é uma proteína com peso molecular estimado entre 20 e 44.2 kDa e altamente sensível a ação da tripsina (MCDONEL, 1980; SAKURAI; DUNCAN, 1977; SONGER, 1996). Apresenta ação citolítica, dermonecrótica e letal, sendo a responsável pelo processo de necrose das mucosas e possivelmente pelas alterações relacionadas com o sistema nervoso central dos animais domésticos nas doenças induzidas pelo *C. perfringens* (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SONGER, 1996). É codificada pelo gene estrutural *cpb*, localizado em um grande plasmídio (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; ROOD, 1998). A toxina β provoca necrose hemorrágica da mucosa intestinal. Embora seja citotóxica, seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Como apresenta uma homologia de aminoácidos com a toxina α , que forma poros na membrana celular eucariótica, Petit, Gibert e Popoff (1999) acreditam que a toxina- β tenha um mecanismo de ação semelhante. É mais sensível a ação de enzimas proteolíticas, temperaturas elevadas e outros fatores ambientais do que as demais toxinas principais do *C. perfringens* (NILO, 1980).

1.2.3 Toxina épsilon (ϵ)

A toxina- ϵ é uma proteína com peso molecular estimado entre 23.2 e 43 kDa (MCDONEL, 1980). Apresenta ação dermonecrótica e letal, produzindo edema no fígado, rins e sistema nervoso central. É codificada pelo gene estrutural *etx*, localizado em um plasmídio de alto peso molecular (BENTANCOR et al., 1999; HUNTER et al., 1992). Essa toxina, produzida durante a multiplicação do

C. perfringens no intestino, é eliminada como prototoxina ϵ , que apresenta toxicidade mínima, mas é convertida para uma forma mil vezes mais tóxica através da remoção proteolítica de um peptídeo N-terminal, decorrente da ação de proteases clostridiais e da própria tripsina intestinal (BHOWN; HABEED, 1977; HUNTER et al., 1992; SONGER, 1996; SWARTZ, 1990). Sua ação só pode ser demonstrada em camundongos após tratamento proteolítico das amostras suspeitas (BALDASSI, 1998). A toxina- ϵ não é internalizada, mas permanece firmemente aderida à membrana plasmática das células. Essa proteína é citotóxica para culturas de células de rim canino porque interage com a membrana celular ao formar um grande complexo (155 kDa) e modificar a permeabilidade da membrana celular através de um mecanismo de ação desconhecido (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). Na enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D, a toxina- ϵ é quase que exclusivamente responsável pela patologia e morte do hospedeiro (NILO, 1980).

1.2.4 Toxina iota (I)

A toxina- ι é uma toxina binária que aumenta a permeabilidade vascular e produz atividade dermonecrótica e letal (BOSWORTH, 1943; CRAIG; MILES, 1961; PERELLE et al., 1993). Consiste de duas cadeias independentes de polipeptídeos: a proteína Ia, que apresenta um peso molecular de 47.5 kDa e age como um componente enzimático; e a proteína Ib, com um peso molecular de 71.5 kDa e que atua como componente de ligação (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; STILES; WILKINS, 1986a; STILES; WILKINS, 1986b). As proteínas Ia e Ib são codificadas, respectivamente, pelos genes *iap* e *ibp*, ambos localizados em plasmídios (PETIT;

GIBERT; POPOFF, 1999; ROOD, 1998). A cadeia pesada Ib reconhece um receptor na superfície celular, sendo necessária para a penetração do componente Ia no citosol. A cadeia leve Ia cataliza a ribosilação de ADP dos monômeros de actina provocando despolimerização desses filamentos e a inibição das funções celulares que são dependentes do citoesqueleto de actina (PERELLE et al., 1993; PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; STILES; WILKINS, 1986b; SONGER, 1996).

1.3 Diagnóstico do *C. perfringens*

O diagnóstico das enterites causadas pelo *C. perfringens* nos animais domésticos é realizado pela avaliação dos sinais clínicos, caracterização das lesões macroscópica e microscópicas, isolamento do agente etiológico em cultivos bacteriológicos e demonstração da presença das toxinas em amostras clínicas e no fluido sobrenadante de culturas puras (SONGER, 1996). O cultivo e isolamento do *C. perfringens* pode exigir meios de cultura seletivos e a identificação da espécie é realizada por meio de provas bioquímicas específicas (BALDASSI, 1998; DAFWANG et al., 1987; UZAL et al., 1996).

Como alternativa aos métodos bacteriológicos para diagnóstico das infecções por *C. perfringens* surgiram testes imunológicos que evidenciam a presença de suas toxinas (MEER; SONGER, 1997). A soroneutralização da letalidade das toxinas principais em camundongos e de seu efeito dermonecrótico em cobaias, empregando antitoxinas padrão (anti- α , anti- β , anti- ϵ e anti-i), são os métodos preconizados para a tipificação do *C. perfringens* (STERNE; BATTY, 1975). Este teste fornece o resultado em até três dias. Se houver toxinas em quantidades

apreciáveis, os animais podem morrer em menos de dez horas. Os resultados da inoculação intradérmica são observados em até dois dias (WALKER, 1990).

A metodologia convencional para diagnóstico e tipificação do *C. perfringens* é onerosa, requer grande quantidade de toxinas ativas, exige um suprimento contínuo de animais de laboratório e fornece resultados não totalmente satisfatórios (BUOGO et al., 1995; DAUBE et al., 1994; KADRA et al., 1999). Esse procedimento requer antitoxinas para cada uma das toxinas principais do *C. perfringens*, cuja disponibilidade comercial vem diminuindo e o preço se tornando cada vez mais elevado (KADRA et al., 1999; WARREN et al., 1999). Baldassi¹ (2000) enfatizou que é muito difícil obter as toxinas padrão desse microrganismo, as quais são imprescindíveis para a produção das antitoxinas em laboratório (informação verbal). A variação da susceptibilidade dos animais de laboratório à presença das toxinas pode conduzir a um falso-diagnóstico (BUOGO et al., 1995). Algumas variantes encontradas dentro dos cinco tipos do *C. perfringens* produzem pequenas quantidades de toxinas ou nem sequer são capazes de produzi-las, o que torna impossível a tipificação destas através do teste de neutralização em camundongos (UZAL et al., 1996; WARREN et al., 1999). Os testes com animais não são adequados para estudos epidemiológicos em larga escala e nem se prestam para a detecção rotineira de organismos toxigênicos (BALDASSI, 1998).

Para contornar os problemas dos ensaios *in vivo* foram desenvolvidos diversos métodos imunológicos *in vitro*. Um desses testes é baseado na inibição do padrão da atividade hemolítica das cepas de campo do *C. perfringens* pelo uso de antisoros anti-tipo A e anti-tipo C (NILO, 1988). Outros métodos, como a imunoeletroforese, a aglutinação do látex, a imunodifusão e o ELISA também foram

¹ Informação fornecida por Baldassi em São Paulo, em 2000.

utilizados para o diagnóstico do *C. perfringens* (BEH; BUTTERY, 1978; EL-IDRISSI; WARD, 1992; HOLDSWORTH; PARRATT, 1994; KADRA et al., 1999; MARTIN; NAYLOR, 1994; MARTIN; NAYLOR; SHARPE, 1988; NAGAHAMA et al., 1991; TRIPATHI et al., 1992).

As técnicas moleculares foram introduzidas para o diagnóstico do *C. perfringens* com a finalidade de evidenciar os genes que codificam as toxinas principais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma dessas técnicas e está causando um grande impacto nos estudos moleculares dos organismos anaeróbios e no diagnóstico de suas infecções. A PCR é capaz de detectar um fragmento de DNA em uma mistura complexa de moléculas. Essa técnica se baseia em amplificações enzimáticas *in vitro* de uma sequência específica de DNA residente entre duas sequências iniciadoras (*primers*) de oligonucleotídeos, que definem as extremidades do fragmento amplificado. A PCR pode multiplicar um fragmento específico por 10^6 a 10^7 vezes até torná-lo detectável (FACH; GUILLOU, 1993; WREN; MULLANY; LAMB, 1991).

Ao determinar a sequência de nucleotídeos do gene que codifica a toxina ϵ no *C. perfringens* tipo D e compará-la com uma sequência já descrita para o mesmo gene no *C. perfringens* do tipo B, Havard, Hunter e Titball (1992), verificaram que as sequências não eram homólogas e, baseados nas diferenças de nucleotídeos, desenvolveram *primers* para a técnica de PCR capazes de diferenciar os tipos B e C do *C. perfringens* tão somente pela análise do gene da toxina ϵ .

Fach e Guillou (1993) desenvolveram um protocolo automatizado de PCR utilizando a DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus* para a amplificação do gene responsável pela produção da toxina α do *C. perfringens*. O conjunto de *primers* selecionado permitiu detectar a presença do microrganismo nas fezes de

ovinos com enterotoxemia com um limite de detecção de aproximadamente 500 bactérias.

Com o objetivo de diagnosticar a presença e tipificar rapidamente cepas de *C. perfringens* isoladas de suínos, Buogo et al. (1995) criaram um protocolo de PCR capaz de detectar os genes *cpa*, *cpb*, *etx* e *cpe*, responsáveis, respetivamente pela produção das toxinas α , β , ϵ e da enterotoxina. Este protocolo, que dispensa a purificação do DNA, demonstrou um limite de detecção de 1000 bactérias.

Analisando amostras de *C. perfringens* isoladas de seres humanos, aves domésticas e silvestres, bovinos, caninos, caprinos, equinos, felinos, ovinos e suínos, além de rações para animais, Songer e Meer (1996) verificaram, por meio de reações individuais de PCR, que o genótipo dos isolados concordou com o fenótipo em 99,2% dos casos. As amostras de bovinos testadas foram classificadas como pertencentes aos tipos A, C, D e E.

Meer e Songer (1997), utilizando a técnica de PCR multiplex, testaram amostras de *C. perfringens* provenientes seres humanos e animais domésticos, tais como aves, bovinos, caninos, caprinos, ovinos e suínos. Foram utilizados *primers* para os genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap* (responsável pela produção da toxina I) e *cpe*. Os autores verificaram que o genótipo concordou com o fenótipo em 99% das amostras pesquisadas. As amostras provenientes de bovinos demonstraram ser dos tipos A, C e E.

Yamagishi et al. (1997) compararam os resultados da tipificação do *C. perfringens* por PCR com aqueles obtidos pela soroneutralização das toxinas em camundongos e cobaias. Os autores concluíram que o diagnóstico molecular é uma alternativa adequada para os testes com animais e que os genes *cpb*, *etx* e *iap* podem ser perdidos quando amostras de *C. perfringens* são armazenadas por um

longo período de tempo.

Uzal et al. (1997), para identificar e tipificar o *C. perfringens* em amostras de fezes de caprinos, adaptaram um processo de lise direta de massa celular ao protocolo de PCR. Esse método, quando utilizado para tipificar o *C. perfringens* em amostras fecais artificialmente contaminadas, demonstrou um limiar de detecção de até 100 bactérias.

Para avaliar a presença dos genes *cpa* e *cpe* de *C. perfringens* em amostras de fezes de suínos e em rações administradas para esses animais, Kanakaraj et al. (1998) desenvolveram uma técnica de PCR multiplex, que evidenciou a presença de isolados portadores do gene *cpa* e descartou a existência do gene *cpe* tanto nas fezes e conteúdo intestinal quanto nas rações fornecidas para a alimentação dos suínos pesquisados.

Warren et al. (1999) obtiveram sucesso ao utilizar a técnica de PCR para identificar os genes *cpa*, *cpb* e *etx* do *C. perfringens* em amostras clínicas de intestino de caprinos e ovinos, fixados pela formalina e incrustados em parafina.

Para diagnosticar a presença e tipificar o *C. perfringens* em amostras clínicas de ovinos, Kadra et al. (1999) utilizaram os métodos bacteriológicos clássicos e o teste de soroneutralização em camundongos, comparando os resultados com aqueles obtidos por PCR. Os autores utilizaram *primers* direcionados para a detecção dos genes *cpa*, *cpb*, *etx* e *cpe* de *C. perfringens* e concluíram que, nas condições do experimento, a PCR demonstrou ser mais rápida, mais específica e mais sensível do que os métodos clássicos.

Vahjen et al. (2000), desenvolveram uma técnica de digoxigenina (DIG) PCR semiquantitativa para avaliar a ação de aditivos alimentares sobre a população de *C. perfringens* tipo C em suínos. Esse método baseou-se na marcação dos produtos

da amplificação do gene *cpb* com DIG e na avaliação da intensidade da quimioluminescência produzida ao final da reação. A DIG-PCR semiquantitativa demonstrou ser capaz de monitorar as variações no tamanho da população do *C. perfringens* no trato intestinal dos animais.

O estudo realizado por Garmory et al. (2000) produziu uma técnica de PCR multiplex capaz de detectar os genes *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap* e *cpe* de *C. perfringens* em isolados de equinos, ovinos, suínos, sendo que a maioria desses isolados foi classificada como pertencente ao tipo A. Também foram testados por esta técnica doze isolados provenientes de bovinos, sendo onze deles caracterizados como do tipo A e apenas um como do tipo E.

Gkiourtzidis et al. (2001) analisaram, pelo emprego de PCR, a distribuição dos genes *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap* e *cpe* em isolados de campo do *C. perfringens*, provenientes de ovinos com diagnóstico clínico de desenteria, e determinaram a prevalência dos tipos toxigênicos como sendo de 46% para o tipo B, 20% para o tipo C e 28% para o tipo D.

O diagnóstico direto de um patógeno em um grande número de amostras requer técnicas de identificação práticas e rápidas (VAHJEN et al., 2000). A correta identificação das variantes do *C. perfringens* é crítica para estudos epidemiológicos e para o desenvolvimento de medidas preventivas efetivas (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999).

A técnica da PCR é específica e sensível, permitindo o processamento de muitas amostras em um curto período de tempo e uma determinação mais completa das variantes do *C. perfringens* (MEER; SONGER, 1997; PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; VAHJEN et al., 2000).

Embora a técnica da PCR apresente as vantagens acima descritas, não foi

possível verificar na literatura científica consultada qualquer trabalho que mencionasse a aplicação dessa metodologia para o diagnóstico e tipificação do *C. perfringens* isolado de bovinos em nosso meio. A PCR solucionaria o problema de indisponibilidade de antitoxinas padrão e eliminaria o uso de animais de laboratório para a tipificação do *C. perfringens*.

2 OBJETIVOS

a) Avaliar a técnica de PCR para detecção dos genes que codificam as toxinas α , β e ϵ do *C. perfringens* a partir do cultivo bacteriológico das cepas padrão desse microrganismo.

b) Pesquisar, pela técnica de PCR, os genes que codificam as toxinas para tipificar as amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos pelo Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

c) Correlacionar a presença dos genes que codificam as toxinas α , β e ϵ de *C. perfringens* detectados pela técnica de PCR, com os resultados obtidos pelos testes de toxigenicidade *in vivo*.

3 MATERIAL

Para efetuar o isolamento e o diagnóstico foram utilizadas cepas padrão e de campo do *C. perfringen*.

3.1 Cepas padrão

Foram utilizadas cepas padrão de *C. perfringens* dos tipos A, B, C e D gentilmente cedidas pela Dra. Lucia Baldassi, do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

3.2 Cepas de campo

Trinta e cinco cepas de campo de *C. perfringens* foram isoladas a partir de amostras de fezes e órgãos (fígado, rim, músculo e coração) encaminhadas, em caixa isotérmica contendo gelo, ao Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

4 MÉTODO

Para o diagnóstico do *C. perfringens* foi utilizada a metodologia convencional de cultivo bacteriológico e a técnica de PCR.

4.1 Metodologia convencional de diagnóstico do *C. perfringens*

A metodologia convencional de diagnóstico do *C. perfringens* consiste no cultivo e isolamento do microrganismo em meios bacteriológicos especiais e na identificação do agente por meio de provas bioquímicas específicas.

4.1.1 Cultivo das cepas de campo e padrão

A metodologia para cultivo das cepas de campo e padrão de *C. perfringens* foi adaptada daquela descrita por Baldassi (1998).

Cada uma das cepas, de campo e padrão, foi inoculada em um tubo contendo caldo de carne cozida previamente aquecido a 100°C por 10 minutos e resfriado rapidamente (regeneração). Esse tubo foi mantido em estufa bacteriológica por 24 a 48 horas a 37°C. De cada cultivo foi coletado um volume de 3.0 µL e esse material foi semeado, por estriamento, em placa contendo ágar sangue de carneiro a 5%. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose em jarras de McIntosh & Fields, a 37°C, por 18 a 24 horas.

Após a incubação, as colônias foram observadas com relação ao aspecto,

coloração, presença e tipo de hemólise. A morfologia bacteriana foi verificada por esfregaços corados pelo método de Gram. Colônias lisas, arredondadas e brilhantes, circundadas por zona de dupla hemólise foram isoladas e semeadas em caldo de carne cozida e incubadas à 37°C, por 18 a 24 horas.

As culturas foram submetidas às seguintes provas bioquímicas complementares para identificação da espécie: produção de lecitinase e fermentação tumultuosa do leite.

Após cada etapa do cultivo foram confeccionados esfregaços corados pelo método de Gram para confirmar a presença de bacilos Gram-positivos.

4.1.2 Determinação da toxigenicidade das cepas de campo

A determinação da toxigenicidade das cepas de campo de *C. perfringens* foi adaptada daquela descrita por Baldassi (1998).

Das cepas de campo, identificadas bioquimicamente como *C. perfringens*, cinco colônias foram transferidas para um tubo contendo 10 mL de caldo triptose e extrato de levedura, seguido de incubação por 5 horas a 37°C. A cultura final foi submetida à centrifugação (centrífuga IEC DPR-600 - International Equipment Company) a 5.000 x g, 10°C, por 15 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante de cada cultura foi separado para os testes *in vivo* para os quais foram utilizados oito camundongos albinos pesando entre 20 a 25 g e uma cobaia albina pesando entre 250 a 350 g. A inoculação de camundongos obedeceu o seguinte esquema: via intraperitoneal, com a dose de 0,5 mL - dois animais receberam o sobrenadante puro e dois receberam o sobrenadante

tratado com tripsina na concentração final de 1% e incubado a 37°C por 30 minutos; via endovenosa, com a dose de 0,1 mL - dois animais receberam o sobrenadante puro e dois receberam o sobrenadante tratado com tripsina. A cobaia, por sua vez, teve seus flancos tricotomizados e foi inoculada, por via intradérmica, no lado esquerdo do corpo, com a dose de 0,1 mL de sobrenadante puro e, do lado direito, com 0,1 mL do sobrenadante tratado com tripsina. Os camundongos e as cobaia inoculados foram observados por até 96 horas, tendo sido registrados para cada espécie animal, como sinal positivo para a presença de toxina, respectivamente, a morte e o aparecimento de lesões cutâneas.

4.2 Metodologia de diagnóstico pela técnica de PCR

O protocolo para a técnica de PCR foi baseado naquele descrito por Meer e Songer (1997).

4.2.1 Extração do DNA

As células das culturas de *C. perfringens* foram colhidas por meio de centrifugação (5.000 x g, por 15 minutos) do caldo de carne cozida, lavadas uma vez com água de Milli-Q e ressuspendidas em 1,5 mL da solução TE. Desta suspensão bacteriana foram tomados 100 µL e adicionados a igual volume de tampão de lise (AUSUBEL et al., 1999) contendo 20 µL de pK 20 mg/mL, 20 µL SDS a 10% e 40 µL de tampão (100mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 250 mM de NaCl) e mantido a

56°C por 90 minutos. A seguir foi realizada a extração descrita por Chomkzynsky (1993).

4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase

Os *primers* utilizados na técnica de PCR foram os descritos por Meer e Songer (1997).

Toxina- α (gene *cpa*): o fragmento amplificado deve conter 324 pb.
5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGACC-3' - posição 1438-1457.
5'-TCTGATACATCGTGTAAAG-3' - posição 1762-1743.

Toxina- β (gene *cpb*): o fragmento amplificado deve conter 196 pb.
5'-GCGAATATGCTGAATCATCTA-3' - posição 871-891.
5'-GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3' - posição 1067-1046.

Toxina- ϵ (gene *etx*): o fragmento amplificado deve conter 655 pb.
5'-GCGGTGATATCCATCTATTC-3' - posição 227-246.
5'-CCACTTACTTGTCTACTAAC-3' - posição 882-862.

Para cada par de *primers* foi realizada uma PCR num volume final de 50 μ L contendo triton a 0,5%, 1X Reaction Buffer (Gibco BRL), 0,1 mM de cada dNTP's, 25 pmoles de cada *primer*, 2 mM de $MgCl_2$, 2,5U de Taq DNA polimerase e H_2O ultrapura q.s.p. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 minutos e 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Um volume de 10 μ L de cada produto obtido foi submetido à eletroforese por 30 minutos a 100V em um gel de agarose a 1.5% contendo 0.5 μ g de brometo de etídio/mL. As bandas amplificadas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta. Um padrão de peso molecular com incrementos de 100 pb foi utilizado.

4.3 Sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de culturas puras

Para determinar a sensibilidade analítica da técnica de PCR, foi utilizada uma cepa padrão de *C. perfringens* do tipo B, que contem os genes *cpa*, *cpb* e *etx*, cultivada em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%.

Após extração, o DNA bacteriano foi quantificado em espectrofotômetro e adicionado a tubos contendo TE de maneira a obter concentrações decrescentes variando de 2270 ng/μL até 227 pg/μL.

Cada uma das diluições foi submetida ao ensaio de PCR descrito acima de modo a determinar a menor concentração de DNA bacteriano capaz de produzir uma reação positiva na técnica de PCR, para cada um dos genes.

4.4 Pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* em cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos pela técnica de PCR

As cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos foram submetidas a técnica de PCR para pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* conforme está descrito no item 4.2.

4.5 Relação entre a presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* e os resultados obtidos pelo teste de toxigenicidade

Os resultados obtidos pelo teste de toxigenicidade *in vivo* foram analisados para verificar eventuais correlações com a presença dos genes que codificam as toxinas α , β e ϵ de *C. perfringens* detectados pela técnica de PCR.

5 RESULTADOS

Os resultados do diagnóstico do *C. perfringens* pela metodologia de cultivo bacteriológico convencional e pela técnica de PCR são descritos a seguir.

5.1 Isolamento de *C. perfringens* a partir de amostras clínicas de bovinos

O quadro 2 apresenta os dados das trinta e cinco cepas de *C. perfringens* isoladas a partir de amostras clínicas de bovinos, de acordo com a proveniência (município e estado) e material clínico empregado. Todas essas amostras demonstraram resultados positivos nos cultivos bacteriológicos a que foram submetidas. Foram considerados resultados positivos: no meio de caldo de carne cozida - a turvação decorrente da multiplicação bacteriana e o deslocamento do tampão de vaselina devido à produção de gás; no meio de ágar sangue de carneiro a 5% - a presença de colônias lisas, arredondadas e brilhantes, circundadas por zona de dupla hemólise; no meio de ágar gema de ovo - a existência de colônias arredondadas com zona de opalecimento devido a ação da lecitinase; no meio de leite desnatado - o surgimento da fermentação tumultuosa.

Nº	Origem	Amostra clínica
1	Barra do Piraí / RJ	Fígado
2	Londrina / PR	Fezes
3	Pimenta Bueno / RO	Fezes
4	Jaguaruna / SC	Fezes
5	Registro / SP	Fezes
6	Jaguaruna / SC	Intestino
7	Nova Rezende / MG	Intestino
8	Guaratinguetá / SP	Fezes
9	Guaratinguetá / SP	Fezes
10	Guaratinguetá / SP	Fezes
11	São José dos Campos / SP	Medula Ossea
12	Uberlândia / MG	Fígado
13	Uberlândia / MG	Coração
14	São Paulo / SP	Intestino
15	Iguape / SP	Fezes
16	Paragominas / PA	Rim
17	João Teixeira / RO	Fígado
18	Borborema / SP	Fígado
19	Nova Mutum / MT	Intestino
20	Guaratinguetá / SP	Fígado
21	Buri / SP	Fígado
22	Guarapuava / PR	Coração
23	Bonfim Paulista / SP	Fígado / Rim
24	Guaratinguetá / SP	Intestino
25	Itu / SP	Linfonodo
26	Guaratinguetá / SP	Fezes
27	Franca / SP	Fígado / Rim
28	Guaratinguetá / SP	Intestino
29	Fortaleza / CE	Fígado
30	Guarapuava / PR	Musculo Esquelético
31	São João da Boa Vista / SP	Fígado
32	Bragança Paulista / SP	Fígado
33	Salgado de São Felix / PB	Rim
34	Iacre / SP	Intestino
35	Jacupiranga / SP	Medula Óssea

Quadro 2 - Cepas de *C. perfringens* isoladas a partir de amostras clínicas de bovinos, de acordo com a proveniência (município e estado) e material clínico empregado. São Paulo, 2004

5.2 Sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de cepas padrão

A figura 1 demonstra a sensibilidade analítica da técnica de PCR utilizada na detecção dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de culturas puras de cepa padrão do *C. perfringens* do tipo B. Nas canaletas de 1 a 5, 6 a 10 e 11 a 15, as concentrações de DNA bacteriano foram decrescendo de 2270 ng/μL até 227 pg/μL. A sensibilidade analítica atingiu 2,27 ng/μL com *primers* para *cpa*, 227 pg/μL com *primers* para *cpb* e 227 pg/μL com *primers* para *etx*.

5.3 Pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* em cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos

Para a pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* foram utilizadas trinta e cinco cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos. Todas as cepas apresentaram resultados positivos nos testes bioquímicos a que foram submetidas. A tipificação pela técnica de PCR classificou 16 (45,7%) amostras como sendo do tipo A, 18 (51,4%) como do tipo C e 1 (2,9%) do tipo B (Quadro 3; Gráfico 1). A Figura 2 exemplifica os resultados de tipificação obtidos pela técnica de PCR com algumas das cepas isoladas.

Figura 1 - Eletroforese em gel dos produtos da técnica de PCR corados com brometo de etídio para avaliação da sensibilidade analítica na detecção dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de culturas puras de cepa padrão do tipo B do *C. perfringens*. Canaletas 1 a 5 = 2270 ng/μL até 227 pg/μL de DNA bacteriano com *primers* para *cpa*, a seta branca aponta a sensibilidade analítica de 2,27 ng/μL. Canaletas 6 a 10 = 2270 ng/μL até 227 pg/μL de DNA bacteriano com *primers* para *cpb*, a seta branca aponta a sensibilidade analítica de 227 pg/μL. Canaletas 11 a 15 = 2270 ng/μL até 227 pg/μL de DNA bacteriano com *primers* para *etx*, a seta branca aponta a sensibilidade analítica de 227 pg/μL. As setas negras indicam a quantidade de pares de bases (bp) dos fragmentos amplificados São Paulo, 2004

Nº	Origem	Amostra clínica	PCR
1	Barra do Piraí / RJ	Fígado	C
2	Londrina / PR	Fezes	C
3	Pimenta Bueno / RO	Fezes	C
4	Jaguaruna / SC	Fezes	C
5	Registro / SP	Fezes	A
6	Jaguaruna / SC	Intestino	C
7	Nova Rezende / MG	Intestino	A
8	Guaratinguetá / SP	Fezes	A
9	Guaratinguetá / SP	Fezes	C
10	Guaratinguetá / SP	Fezes	C
11	São José dos Campos / SP	Medula Ossea	A
12	Uberlândia / MG	Fígado	A
13	Uberlândia / MG	Coração	A
14	São Paulo / SP	Intestino	C
15	Iguape / SP	Fezes	A
16	Paragominas / PA	Rim	A
17	João Teixeira / RO	Fígado	A
18	Borborema / SP	Fígado	A
19	Nova Mutum / MT	Intestino	A
20	Guaratinguetá / SP	Fígado	B
21	Buri / SP	Fígado	C
22	Guarapuava / PR	Coração	A
23	Bonfim Paulista / SP	Fígado / Rim	C
24	Guaratinguetá / SP	Intestino	A
25	Itu / SP	Linfonodo	A
26	Guaratinguetá / SP	Fezes	C
27	Franca / SP	Fígao / Rim	C
28	Guaratinguetá / SP	Intestino	C
29	Fortaleza / CE	Fígado	C
30	Guarapuava / PR	Musculo Esquelético	C
31	São João da Boa Vista / SP	Fígado	A
32	Bragança Paulista / SP	Fígado	A
33	Salgado de São Felix / PB	Rim	C
34	Iacre / SP	Intestino	C
35	Jacupiranga / SP	Medula Óssea	C

Quadro 3 - Cepas de *C. perfringens* isoladas a partir de amostras clínicas de bovinos, de acordo com a proveniência (município e estado), material clínico empregado e resultados da tipificação das cepas pela técnica de PCR. São Paulo, 2004

Gráfico 1 - Porcentagem das cepas de *C. perfringens* de bovinos tipificadas pela técnica de PCR como pertencentes aos tipos A, B e C. São Paulo, 2004

Figura 2 - Eletroforese em gel dos produtos da técnica de PCR corados com brometo de etídio demonstrando resultados de tipificação de algumas cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos. Canaletas 1 a 3 = cepa do tipo A. Canaletas 4 a 6 = cepa do tipo B. Canaletas 7 a 9 = cepa do tipo C. Canaletas 1, 4 e 7 = amplificação com *primers* para *cpa*. Canaletas 2, 5 e 8 = amplificação com *primers* para *cpb*. Canaletas 3, 6 e 9 = amplificação com *primers* para *etx*. As setas negras indicam a quantidade de pares de bases (bp) dos fragmentos amplificados. São Paulo, 2004

5.4 Relação entre a presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* e os resultados obtidos pelo teste de toxigenicidade

Para o teste de toxigenicidade foram utilizadas vinte e quatro cepas de *C. perfringens* isoladas de bovinos. Todas as cepas foram confirmadas como positivas nos testes bioquímicos a que foram submetidas.

Nesse teste, foi utilizado um total de cento e noventa e dois camungongos e vinte e quatro cobaias. Os animais, fornecidos pelo Biotério do Instituto Biológico, foram separados em lotes, conforme a espécie, e mantidos em caixas plásticas tampadas com grade metal e uma camada de maravalha. Um suprimento constante e farto de água e ração foi disponibilizado. A higienização das caixas e a troca da camada de maravalha se deram conforme a necessidade.

O resultado do teste de toxigenicidade para camundongos e cobaias, após um período de observação de 96 horas, foi considerado positivo quando, respectivamente, houve a morte ou o surgimento de lesão dermonecrótica e negativo, quando os animais sobreviveram ou não apresentaram lesão cutânea.

Dessa forma, foram detectados sete padrões de reatividade no teste de toxigenicidade *in vivo* (Quadro 4), onde mais de uma amostra pôde ser classificada. Outros sete padrões foram observados com apenas uma amostra cada um (amostras 29 a 35). Todavia, nenhuma relação evidente pôde ser observada entre o padrão de reatividade no teste de toxigenicidade *in vivo* e tipificação obtida pela técnica de PCR

	Nº	IP camundongo		EV camundongo		ID cobaia		PCR
		s/tripsina	c/tripsina	s/tripsina	c/tripsina	s/tripsina	c/tripsina	
	1	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	5	nr	nr	nr	nr	nr	nr	A
	6	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	7	nr	nr	nr	nr	nr	nr	A
	8	nr	nr	nr	nr	nr	nr	A
	9	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	10	nr	nr	nr	nr	nr	nr	C
	11	nr	nr	nr	nr	nr	nr	A
Padrão I →	12	pos	pos	pos	pos	pos	pos	A
	13	pos	pos	pos	pos	pos	pos	A
	14	pos	pos	pos	pos	pos	pos	C
Padrão II →	15	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
	16	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
	17	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
Padrão III →	18	pos	pos	neg	neg	pos	pos	A
	19	pos	pos	neg	neg	pos	pos	A
Padrão IV →	20	pos	pos	neg	neg	pos	neg	B
	21	pos	pos	neg	neg	pos	neg	C
Padrão V →	22	pos	neg	pos	neg	pos	neg	A
	23	pos	neg	pos	neg	pos	neg	C
Padrão VI →	24	neg	neg	neg	neg	pos	neg	A
	25	neg	neg	neg	neg	pos	neg	A
Padrão VII →	26	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
	27	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
	28	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
	29	pos	pos	pos	neg	pos	pos	C
	30	pos	neg	pos	neg	pos	neg	C
	31	neg	neg	neg	pos	pos	neg	A
	32	neg	neg	neg	neg	pos	pos	A
	33	pos	neg	pos	neg	neg	neg	C
	34	neg	neg	neg	pos	neg	neg	C
	35	pos	neg	neg	neg	neg	neg	C

Nota: pos = resultado positivo.
neg = resultado negativo.
nr = prova não realizada.

IP = via intraperitoneal.
EV = via endovenosa.
ID = via intra-dérmica.

Quadro 4 - Resultados dos testes de toxigenicidade *in vivo* com a determinação dos padrões de reatividade e da tipificação do *C. perfringens* pela técnica de PCR. São Paulo, 2004

6 DISCUSSÃO

A metodologia bacteriológica clássica mostrou-se adequada para determinar a presença do *C. perfringens* nas amostras clínicas de bovinos pesquisadas, porém a execução dessa técnica demonstrou ser laboriosa, exigindo vários dias até completar o diagnóstico de cada amostra.

O teste de toxigenicidade revelou a presença de atividade tóxica sensível ou não ao tratamento com tripsina. Algumas amostras de *C. perfringens* produziram quantidade de toxinas suficiente para matar camundongos em menos de uma hora, tendo sido essa observação compartilhada por Baldassi et al. (1995) a partir de isolados provenientes de caprinos. Por outro lado, algumas amostra não mataram camundongos e nem produziram qualquer tipo de lesão cutânea nas cobaias. Buogo et al., (1995) sugere que essa situação pode ocorrer devido à variação individual na susceptibilidade dos animais à presença das toxinas e Holdeman, Cato e Moore (1977 apud SONGER, 1996) descreve cepas de *C. perfringens* do tipo A produtoras de reduzidas quantidades de toxina α ou até mesmo incapazes de produzi-la. Desse modo, o teste de toxigenicidade tem pouco ou quase nenhum valor na tipificação do *C. perfringens* isolado, servindo apenas como indicador do poder toxigênico de uma amostra (BALDASSI, 1998).

A técnica de PCR detectou a presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* nas cepas padrão de *C. perfringens*, produzindo fragmentos amplificados com tamanhos, respectivamente, de 324 pb, 196 pb e 655 pb. É preciso salientar que o gene *cpa* é considerado característico da espécie e por ser altamente conservado, sua amplificação, por si só, já é suficiente para diagnosticar a presença do *C. perfringens* em uma amostra (BUOGO et al., 1995; TSUTSUI et al, 1995).

A tipificação por PCR das trinta e cinco amostras de campo de *C. perfringens* revelou a presença de 16 (45,7%) amostras do tipo A com presença exclusiva do gene *cpa*, 18 (51,4%) amostras do tipo C com a detecção dos genes *cpa* e *cpb* e 1 (2,9%) amostra do tipo B demonstrando a existência concomitante dos genes *cpa*, *cpb* e *etx*.

Apesar da escolha das amostras não ter ocorrido de forma aleatória, a distribuição encontrada mostra um forte predomínio das amostras dos tipos A e C. McDonel (1980) e Hatheway (1990) apontam os tipos B e D como os mais prevalentes para bovinos. Estes autores não dispunham da metodologia de PCR para detecção dos genes, baseando a tipificação em características fenotípicas (soroneutralização das toxinas). Digno de nota é o comentário feito por ambos quanto a possibilidade de tipificações incorretas decorrentes do nível insuficiente de expressão das diferentes toxinas. Songer e Meer (1996), utilizando a técnica de PCR, testaram cento e nove amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos e as classificaram como pertencentes aos tipos A, C, D e E. Meer e Songer (1997) demonstraram a presença dos tipos A, C e E em um grupo de amostras de *C. perfringens* provenientes de bovinos. Garmory et al. (2000), também utilizando a PCR, testaram doze amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos e classificaram onze delas como pertencentes ao tipo A e apenas uma como do tipo E.

Em nosso meio não se pode verificar, na literatura compulsada, trabalhos que tenham objetivado tipificar, pela técnica de PCR, amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos. Esta escassez de dados certamente é fruto das dificuldades (custo e disponibilidade) encontradas na obtenção de soros de referência específicos fornecidos por órgãos internacionais, para a realização da prova de soroneutralização. Dessa forma, no âmbito nacional, não há parâmetros para

comparar a distribuição dos tipos de *C. perfringens* detectados pela reação de PCR neste estudo.

7 CONCLUSÃO

a) Foi possível padronizar a técnica de PCR para detectar a presença dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de culturas de *C. perfringens*.

b) A sensibilidade analítica da técnica de PCR a partir de culturas de *C. perfringens* foi de 2,27 ng/μL para o gene *cpa*, 22,7 pg/μL para o gene *cpb* e 22,7 pg/μL para o gene *etx*.

c) A pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* a partir de 35 amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos revelou que 16 (45,7%) eram do tipo A; 18 (51,4%) eram do tipo C e 1 (2,9%) era do tipo B. Não foi observada nenhuma amostra do tipo D.

d) A metodologia de PCR desenvolvida revelou-se útil na tipificação de amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos, trazendo grande contribuição para o diagnóstico dessa bacteriose em nosso meio, pois: elimina as dificuldades de tipificação de muitos laboratórios oriundas do alto custo e da disponibilidade de anti-soros para a tipificação pela reação de soroneutralização; e, evita a utilização de animais de laboratório .

REFERÊNCIAS

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 1104 p.

BAINS, B. S. Necrotic enteritis of chickens. **Australian Veterinary Journal**, v. 44, n. 1, p. 40, 1968.

BALDASSI, L. **Verificação da toxigenicidade de cepas de *Clostridium perfringens* isoladas de material de origem bovina e sua tipificação pelo ensaio imunoenzimático e eletroforese corada para esterase**. 1998. 114 f. Tese (Doutorado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; PORTUGAL, M. A. S. C.; MOULIN, A. A. P.; MOURÃO, M. A. P. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 2, p. 109-113, 1995.

BEH, K. J.; BUTTERY, S. H. Reverse phase passive haemoagglutination and single radial immunodiffusion to detect epsilon antigen of *Clostridium perfringens* type D. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 11, p. 541-544, 1978.

BEER, J. Infecções e intoxicações por *Clostridium perfringens*. In: _____ **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. v. 2, p. 234-250.

BENTANCOR, A. B.; FERMEPÍN, M. R.; BENTANCOR, L. D.; TORRES, R. A. Detection of the *etx* gene (ϵ -toxin inducer) in plasmids of high molecular weight in *Clostridium perfringens* type D. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 373-377, 1999.

BHOWN, A. S.; HABEED, A. F. S. A. Structural studies of ϵ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D: localization of the site of tryptic scission necessary for activation to ϵ -toxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, n. 3, p. 889-896, 1977.

BILLINGTON, S. J.; WIECKOWSKI, E. U.; SARKER, M. R.; BUSCHEL, D.; SONGER, J. G.; MCCLANE, B. A. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4531-4536, 1998.

BLACKWELL, T. E.; BUTLER, D. G. Clinical signs, treatment, and postmortem lesions in dairy goats with enterotoxemia: 13 cases (1979-1982). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 2, p. 214-217, 1992.

BOSWORTH, T. J. On a new type of toxin produced by *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 53, n. 3, p. 245-255, 1943.

BUOGO, C.; CAPAUL, S.; HÄNI, H.; FREY, J.; NICOLET, J. Diagnosis of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 42, n. 1, p. 51-58, 1995.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

CRAIG, J. P.; MILES, A. A. Some properties of the iota toxin of *Clostridium welchii*, including its action on capillary permeability. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 81, n. 2, p. 481-493, 1961.

DAFWANG, I. I.; RICKE, S. C.; SCHAEFER, D. M.; BROTZ, P. G.; SUNDE, M. L.; PRINGLE, D. J. Evaluation of some commercial media for the cultivation and enumeration of *Clostridium perfringens* from the chick intestine. **Poultry Science**, v. 66, n. 4, p. 652-658, 1987.

DAUBE, G.; CHINA, B.; SIMON, P.; HVALA, K.; MAINIL, J. Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 6, p. 650-655, 1994.

DICKIE, C. W.; KLINKERMAN, D. L.; PETRIE, E. F. Enterotoxemia in two foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 3, p. 306-307, 1978.

DROLET, R.; HIGGINS, R.; CÉCYRE, A. Necrohemorrhagic enterocolitis caused by *Clostridium perfringens* type C in a foal. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, n. 6, p. 449-450, 1990.

EL-IDRISSI, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 389-396, 1992.

FACH, P.; GUILLOU, J. P. Detection by in vitro amplification of the alpha-toxin (phospholipase C) gene from *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 1, p. 61-66, 1993.

FIELD, H. I.; GIBSON, E. A. Studies on piglet mortality. 2. *Clostridium welchii* infection. **Veterinary Record**, v. 67, n. 2, p. 31-34, 1955.

FITZGERALD, G. R.; BARKER, T.; WELTER, M. W.; WELTER, C. J. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. **Veterinary Medicine**, v. 83, n. 1, p. 80-86, 1988.

FRANK, F. W. *Clostridium perfringens* type B from enterotoxemia in young ruminants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 64, p. 492-494, 1956.

GARMORY, H. S.; CHANTER, N.; FRENCH, N. P.; BUESCHEL, D.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. **Epidemiology and Infection**, v. 124, n. 1, p. 61-67, 2000.

GKIOURTZIDIS, K.; FREY, J.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; ILIADIS, N.; SARRIS, K. PCR detection and prevalence of α -, β -, β 2-, ϵ -, ι - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 39-43, 2001.

GRINER, L. A.; AICHELMAN, W. W.; BROWN, G. D. *Clostridium perfringens* type D (epsilon) enterotoxemia in Brown Swiss dairy calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 129, n. 8, p. 375-376, 1956.

GRINER, L. A.; BRACKEN, F. K. *Clostridium perfringens* (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 122, n. 911, p. 99-102, 1953.

GRINER, L. A.; JOHNSON, H. W. *Clostridium perfringens* type C in hemorrhagic enterotoxemia of lambs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 125, n. 929, p. 125-127, 1954.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.

HAVARD, H. L.; HUNTER, S. E. C.; TITBALL, R. W. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and type D. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, n. 1-2, p. 77-81, 1992.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. **Anaerobe laboratory manual**. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977. 200 p.

HOLDSWORTH, R. J.; PARRATT, D. Development of an ELISA assay for *Clostridium perfringens* phospholipase C (alpha toxin). **Journal of Immunoassay**, v. 15, n. 3, p. 293-304, 1994.

HOWARD-MARTIN, M.; MORTON, R. J.; QUALLS, C. W.; MACALLISTER, C. G. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in a newborn foal. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 189, n. 5, p. 564-565, 1989.

HUNTER, S. E. C.; CLARKE, I. N.; KELLY, D. C.; TITBALL, R. W. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 1, p. 102-110, 1992.

JOHNSON, M. W.; FITZGERALD, G. R.; WELTER, M. W.; WELTER, C. J. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. **Veterinary Medicine**. v. 87, n. 4, p. 382-386, 1992.

KADRA, B.; GUILLOU, J. P.; POPOFF, M.; BOURLIOUX, P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 259-266, 1999.

KANAKARAJ, R.; HARRIS, D. L.; SONGER, J. G.; BOSWORTH, B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 29-38, 1998.

LESLIE, D.; FAIRWEATHER, N.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; KEHOE, M. Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with *Bacillus cereus* phospholipase C. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 383-392, 1989.

MACKINNON, J. D. Enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type C. **Pig Veterinary Journal**, v. 22, p. 119-125, 1989.

MARTIN, P. K.; NAYLOR, R. D. A latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 2, p. 259-261, 1994.

MARTIN, P. K.; NAYLOR, R. D.; SHARPE, R. T. Detection of *Clostridium perfringens* beta toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. **Research in Veterinary Science**, v. 44, n. 2, p. 270-271, 1988.

MCDONEL, J. L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmacology and Therapeutics**. v. 10, n. 3, p. 617-655, 1980.

MCGOWAN, G.; MOULTON, J. E.; ROOD, S. E. Lamb losses associated with *Clostridium perfringens* type A. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 133, n. 4, p. 219-221, 1958.

MEER, R. R.; SONGER, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 7, p. 702-705, 1997.

MUMFORD, D. H. Enterotoxemia in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 37, n. 4, p. 122-126, 1961.

NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, S.; OCHI, S.; SAKURAI, J. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 84, n. 1, p. 41-44, 1991.

NIILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. **Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 5, p. 141-148, 1980.

NIILO, L. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 8, p. 658-664, 1988.

NIILO, L. Haemolytic patterns for presumptive identification of *Clostridium perfringens* type C. **Veterinary Record**, v. 122, p. 281, 1988.

NILO, L.; HARRIES, W. N.; JONES, G. A. *Clostridium perfringens* type C in hemorrhagic enterotoxemia of neonatal calves in Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 15, n. 8, p. 224-226, 1974.

OKABE, A.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, H. Cloning and sequencing of a phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 160, n. 1, p. 33-39, 1989.

OXER, D. T. Enterotoxaemia in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 3, p. 62-66, 1956.

PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P.; POPOFF, M. R. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5147-5156, 1993.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.

POPOFF, M. R. Bacteriological examination in enterotoxaemia of sheep and lamb. **Veterinary Record**, v. 114, n. 13, p. 324, 1984.

POPOFF, M. R.; JESTIN, A. Enteropathogenicity of purified *Clostridium perfringens* enterotoxin in pig. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 10, p. 2147-2148, 1985.

PRESCOTT, J. F.; JOHNSON, J. A.; PATTERSON, J. M.; BULMER, W. S. Haemorrhagic gastroenteritis in the dog associated with *Clostridium welchii*. **Veterinary Record**, v. 103, n. 6, p. 116-117, 1978.

ROOD, J. I.; COLE, S. T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiology Reviews**, v. 55, n. 4, p. 621-648, 1991.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 52, p. 333-360, 1998.

ROSE, A. L.; EDGAR, G. Enterotoxaemic jaundice of cattle and sheep: a preliminary report on the aetiology of the disease. **Australian Veterinary Journal**, v. 12, n. 6, p. 212-220, 1936.

RUSSEL, W. C. Type A enterotoxemia in captive wild goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 5, p. 643-646, 1970.

SAINT-JOANIS, B.; GARNIER, T.; COLE, S. T. Gene cloning shows the alpha toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 219, n. 3, p.453-460, 1989.

SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 741-745, 1977.

SMITH, L. D. S. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 254-262, 1979.

SMITH, L .D. S; HOBBS, G. Genus *Clostridium* Prazmowski, 1880. In: R. E. BUCHANAN; N. E. GIBBONS. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. p. 551-572.

SMITH, L.; WILLIAMS, B. L. **The pathogenic anaerobic bacteria**, 3rd ed. Springfield: Charles C. Thomas, 1984. p. 550.

SONGER, J. G.; Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1996.

SONGER, J. G.; MEER, R. R. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. **Anaerobe**, v. 2, n. 4, p. 197-203, 1996.

STERNE, M.; BATTY, I. **Pathogenic clostridia**. London: Butterworth, 1975. 144 p.

STERN. M.; THOMSON, A. The isolation and identification of clostridia from pathological conditions of animal. **Bulletin of Office International of Epizooties**, v. 59, n. 9-10, p. 1487-1489, 1963.

STILES, B. G.; WILKINS, T. D. *Clostridium perfringens* iota toxin: synergism between two proteins. **Toxicon**, v. 24, n. 8, p. 767-773, 1986.

STILES, B. G.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two non linked proteins for biological activity. **Infection and Immunity**, v. 54, n. 3, p.683-688, 1986.

SWARTZ, M. N. Anaerobic spore-forming bacilli. In: DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1990. p. 633-645.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8th ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1988. 951 p.

TITBALL, R. W.; HUNTER, S. E. C.; MARTIN, K. L.; MORRIS, B. C.; SHUTTLEWORTH, A. D.; RUBIDGE, T.; ANDERSON, D. W.; KELLY, D. C. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 367-376, 1989.

TRIPATHI, B. N.; PARIHAR, N. S.; SINGH, K. P.; KUMAR, A. A. Immunodiagnostic tests for the detection of *Clostridium perfringens* type C infection. **Indian Journal of Animal Science**, v. 62, n. 7, p. 607-610, 1992.

TSO, J. Y.; SIEBEL, C. Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 468-476, 1989.

TSUTSUI, K.; MINAMI, J.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S.; TANIGUCHI, Y.; NAKAMURA, S.; NISHIOKA, M.; OKABE, A. Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 24, p. 7164-7170, 1995.

UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; O'BOYLE, D.; KELLY, W. R. Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 13-17, 1996.

UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; KELLY, W. R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 339-344, 1997.

VAHJEN, W.; GOLLNISCH, K.; SIMON, O.; SCHULZ, E. Development of a semiquantitative PCR assay for the detection of the *Clostridium perfringens* type C beta toxin gene in purified nucleic acid extracts from the intestinal tract of pigs. **Journal of Agricultural Science**, v. 134, n. 1, p. 77-87, 2000.

VANDERKOP, M. A.; SUTMOLLER, H. Porcine clostridial enteritis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, n. 4, p. 246-247, 1993.

WALKER, P. D. *Clostridium*. In: CARTER, G. R.; COLE JR., J. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 220-251.

WARREN, A. L.; UZAL, F. A.; BLACKALL, L. L.; KELLY, W. R. PCR detection of *Clostridium perfringens* type D in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of goats and sheep. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 15-19, 1999.

WREN, B. W.; MULLANY, P.; LAMB, F. I. Genetics and molecular biology. In: P. N. LEVETT. **Anaerobic microbiology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 145-162.

YAMAGISHI, T; SUGITANI, K.; TANISHIMA, K.; NAKAMURA, S. Polymerase chain reaction test for differentiation of five toxin types of *Clostridium perfringens*. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 4, p. 295-299, 1997.