SIMONE MIYASHIRO

Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes

**São Paulo
2014**

SIMONE MIYASHIRO

Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo
2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2928
FMVZ

Miyashiro, Simone
Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes / Simone Miyashiro. -- 2014.
97 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. *Clostridium perfringens*. 2. Ruminantes. 3. Enterotoxemia. 4. Toxina alfa. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de *C. perfringens* isolados de ruminantes", protocolado sob o nº 2576/2012, utilizando 200 (duzentos) bovinos, ovinos e caprinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from ruminants", protocol number 2576/2012, utilizing 200 (two hundred) cattle, sheep and goats, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MIYASHIRO, Simone

Título: Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha linda família,
Orgulho e exemplo de uma vida de perseverança, força, amor e união.*

*“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”
Le Petit Prince*

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Nilson Roberti Benites, pela experiência compartilhada e pelos ensinamentos passados;

Aos meus colegas do Instituto Biológico, parceiros deste estudo;

Aos meus diretores do Instituto Biológico, Dra. Josete Garcia Bersano e Dr. Antonio Batista Filho, por permitirem minha dedicação ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao colega Ricardo Harakava pelo auxílio na síntese da curva padrão da reação de PCR em tempo real;

À colega e hoje Professora Vera Letticie Ruiz Azevedo, pela amizade e horas de discussão e aprendizado;

À colega Lucia Baldassi, sempre disponível para me auxiliar no estudo das clostridioses;

À colega Alessandra F.C. Nassar pelo apoio no laboratório e amizade;

À colega Eliana Roxo pela excelente aula sobre formatação de documentos;

Às colegas Bernadete Pereira dos Santos, Cristina Corsi Dib, Melissa Pereira Liauw e Renata Haddad Esper, pela amizade e bom convívio;

Ao pesquisador científico Paulo Reis de Carvalho, pela valiosa ajuda, apoio e incentivo no início da minha carreira como pesquisadora científica;

Aos colegas de pós-graduação, pelos bons momentos;

À FMVZ -USP, por todo ensinamento e base para a conquista de minha realização profissional. À Vet 62, para sempre no coração;

Ao Departamento VPS (Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) da FMVZ-USP, do qual tenho muito orgulho de ter feito parte;

À equipe da Biblioteca da FMVZ-USP pelo auxílio na finalização da tese;

Aos colegas veterinários de campo, super colaboradores deste estudo.

RESUMO

MIYASHIRO, S. **Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes** [Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from ruminants]. 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

C. perfringens é uma bactéria anaeróbia presente no intestino delgado do homem e animais em equilíbrio e, sob a ação de alguns fatores predisponentes como mudança brusca de alimentação ou super alimentação, *stress* no manejo ou alto parasitismo intestinal, há a proliferação do microrganismo com a consequente produção de potentes toxinas que provocam a morte do animal. Dentre as toxinas principais destaca-se a toxina alfa, importante fator de virulência, produzida por todos os tipos de *C. perfringens*, sendo os pertencentes ao tipo A os maiores produtores. A fim de caracterizar o microrganismo em suspeitas de enterotoxemia em ruminantes, trabalhamos com 61 amostras de intestino delgado de bovinos e 12 de ovinos como grupo estudo e no grupo controle composto de animais hígidos levados ao abate, 73 amostras de intestino delgado de bovinos e 24 de ovinos. Foram realizados procedimentos de isolamento e tipagem molecular de *C. perfringens* e quantificação celular, detecção molecular da toxina β_2 , além de avaliações moleculares qualitativa (PCR convencional) e quantitativa (PCR em tempo real) do gene da toxina alfa dos diferentes isolados. Em 29 amostras do grupo estudo bovino (47,54%) e em 4 (33,33%) do grupo estudo ovino isolou-se o microrganismo, em contrapartida no grupo controle bovino não houve isolamento do bacilo e 5 amostras do grupo controle ovino (20,83%) foram positivas. Houve diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos de bovinos ($p < 0,05$). Todos os isolados (100%) foram classificados como tipo A, e os resultados das quantificações celulares de *C. perfringens* revelaram que todos os bovinos controle apresentaram < 10 UFC/g de conteúdo enquanto que o grupo estudo apresentou mediana de 10^4 UFC/g com variações de < 10 UFC/g até 10^8 UFC/g. Nos ovinos, a mediana no grupo controle foi 10^1 UFC/g assim como no grupo estudo, entretanto com clara separação de valores entre os grupos. Tanto na PCR convencional quanto na PCR em tempo real para detecção do RNAm da toxina alfa foi observado limiar de detecção de 10^2 cópias de cDNA por reação, porém provavelmente devido aos valores das amostras estarem próximos ao limite da sensibilidade analítica da reação, não foi observada boa reprodutibilidade da última. Já na reação molecular

convencional, observou-se a presença de detecção de RNAm da toxina alfa em 60,52% dos isolados o que revela alguma diferença da presença do transcrito entre as culturas, já que nas cepas restantes não foi detectada a presença do RNAm em questão. A pesquisa do gene da toxina β_2 revelou sua presença em 54,55% dos isolados de *C. perfringens* corroborando com a afirmativa de que o gene está amplamente distribuído entre os ruminantes. A metodologia aplicada para avaliação da expressão do gene da toxina alfa nos isolados mostrou que há diferenças dos níveis de transcrição porém não permitiu quantificar esses valores. A tipagem molecular corrobora com outros estudos quanto à importância epidemiológica do tipo A nos quadros de enterotoxemia em ruminantes, e os dados da quantificação celular permite-nos concluir que animais sadios possuem um nível basal de *C. perfringens* <10 UFC/g de conteúdo que não possibilita o seu isolamento.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*. Ruminantes. Enterotoxemia. Toxina alfa

ABSTRACT

MIYASHIRO, S. **Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from ruminants**. [Caracterização de isolados de *Clostridium perfringens* de ruminantes]. 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

C. perfringens is an anaerobe present in small intestine of man and animals in equilibrium, and under some predisposing factors such as sudden feeding change or super feeding, rough management or high intestinal parasitism, the microorganism multiplies with the consequent production of potent toxins that can cause animal death. Amongst the main toxins, alpha toxin is an important virulence factor, that is produced by all *C. perfringens* types, and those belonging to type A are its higher producer. Aiming to characterize the microorganism in ruminants suspect of enterotoxaemia, we evaluated 61 bovine small intestinal samples and 12 sheep small intestines as the study group, and for the control group composed by higid animals led to slaughterhousing, 73 bovine small intestines and 24 ovine samples. We performed microbiological culture and molecular typing of *C. perfringens* isolates, cellular quantification, molecular detection of $\beta 2$ toxin, and qualitative and quantitative molecular evaluations of alpha toxin from different isolates by means of conventional PCR and real time PCR, respectively. In 29 samples from the bovine study group (47.54%) and in 4 (33.33%) from ovine study group the microorganism was isolated, however in the bovine control group there was no isolation success and 5 samples from sheep control group (20.83%) were positive. There was statistically significant difference only between bovine groups ($p < 0,05$). All isolates (100%) were classified as type A, and *C. perfringens* cellular quantification results showed that every control bovine presented < 10 CFU/g of intestinal contents while the study group presented a median of 10^4 CFU/g with results ranging from < 10 CFU/g to 10^8 CFU/g. In sheep, the median value in the control group was 10^1 CFU/g as in the study group, but with a clear division of values between the groups. We observed the threshold detection of 10^2 cDNA copies per reaction in both conventional and real time PCR reactions for alpha toxin mRNA detection, however since the samples quantification values were close to the analytical sensitivity of the test, we could not observe the reproducibility in the last technique. In the conventional PCR reaction, alpha toxin mRNA was detected in 60.52% of the isolates. This result reveals some

difference in the transcript presence among the cultures, since we could not detect the presence of the described mRNA in the other isolates. Beta2 toxin gene was detected in 54.55% of *C. perfringens* isolates corroborating with the affirmative that this gene is widely distributed among ruminants. The methodology presented herein for the evaluation of alpha toxin gene expression showed that there are differences in the transcription levels, however it didn't allow to quantify these values. Molecular typing results agree with other studies regarding the epidemiological importance of type A in the enterotoxaemia processes in ruminants, and the cellular quantification data allow us to conclude that healthy animals show a basal level of *C. perfringens* <10 CFU/g of intestinal content that doesn't allow its isolation.

Keywords: *Clostridium perfringens*. Ruminants. Enterotoxaemia. Alpha toxin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do isolamento de <i>C. perfringens</i> nos Grupos Estudo e Controle	55
Tabela 2 - Resultados da detecção do gene da toxina $\beta 2$ nos isolados de <i>Clostridium perfringens</i>	58
Tabela 3 - Resultados do isolamento de <i>C. perfringens</i> e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos bovinos do grupo Controle	59
Tabela 4 - Resultados do isolamento de <i>C. perfringens</i> e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos bovinos do grupo Estudo	59
Tabela 5 - Resultados do isolamento de <i>C. perfringens</i> e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos ovinos do grupo Controle	61
Tabela 6 - Resultados do isolamento de <i>C. perfringens</i> e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos ovinos do grupo Estudo	61
Tabela 7 - Valores de Cq obtidos na reação de PCR quantitativa em tempo real para detecção do gene da toxina alfa.....	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do vetor de clonagem pGEM-T Easy, ressaltando as enzimas de restrição no sítio múltiplo de clonagem. Amp ^r - gene de resistência a ampicilina; Ori- origem de replicação; Lac Z – operon lac ...	51
Figura 2 - Foto da análise da curva de <i>melting</i> das amostras da curva padrão da PCR em tempo real para detecção da toxina alfa mostrando pico de aproximadamente 78°C	64
Gráfico 1 - Resultados referentes à porcentagem de isolamento de <i>C. perfringens</i> nos grupos Estudo e Controle de bovinos e ovinos.....	55
Gráfico 2 - Representação da distribuição de recebimento de amostras de animais com suspeita de enterotoxemia onde foi isolado o microrganismo.....	56
Gráfico 3 - Resultados de proliferação celular de <i>C. perfringens</i> nos grupos dos bovinos	60
Gráfico 4 - Resultados de proliferação celular de <i>C. perfringens</i> nos grupos dos ovinos.....	62
Foto 1 - Meio Tarozzi.....	44
Foto 2 - Colônias de <i>Clostridium perfringens</i> apresentando dupla hemólise	44
Quadro 1 - Tipagem de <i>Clostridium perfringens</i> de acordo com a produção das toxinas.....	19
Quadro 2 - <i>Primers</i> utilizados para tipagem de <i>Clostridium perfringens</i>	45
Quadro 3 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para detecção do gene da toxina β2	46
Quadro 4 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificação de fragmento do gene da toxina α para desenho da curva padrão	50
Quadro 5 - Resultados gerais das amostras/espécie, quantificação de <i>C. perfringens</i> (Quantificação CP), e resultados da PCR convencional e PCR em tempo real.....	66

Esquema 1 - Metodologia para quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> nas amostras de intestino delgado	42

Fluxograma 1 - Resumo dos procedimentos aplicados nas amostras de intestino delgado	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	<i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	24
2.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS PRINCIPAIS TOXINAS PRODUZIDAS POR <i>C. PERFRINGENS</i>	26
2.2.1	Toxina alfa (α)	26
2.2.2	Toxina beta (β).....	28
2.2.3	Toxina epsilon (ϵ).....	29
2.2.4	Toxina iota (ι)	30
2.2.5	Enterotoxina (CPE).....	30
2.2.6	Toxina beta 2 (β_2)	31
2.2.7	Enterotoxemia.....	32
2.2.8	Diagnóstico	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	QUANTIFICAÇÃO DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	41
3.2	ISOLAMENTO E TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	43
3.3	PESQUISA DO GENE DA TOXINA β_2	45
3.4	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO RNAm DA TOXINA ALFA.....	46
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE RNAm DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC)	47
3.5.1	Extração de RNA.....	47
3.5.2	Transcrição reversa com <i>primers</i> randômicos.....	48
3.5.3	Transcrição reversa com <i>primer</i> específico	49
3.5.4	Quantificação da transcrição do gene <i>plc</i> (qPCR).....	49
3.5.5	Curva padrão.....	50

3.5.5.1	Amplificação de DNA de amostra de <i>C. perfringens</i> e clonagem	50
3.5.6	PCR em tempo real.....	52
3.6	PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC) ..	53
4	RESULTADOS.....	55
4.1	ISOLAMENTO DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	55
4.2	TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>C. PERFRINGENS</i>	57
4.3	DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA $\beta 2$	57
4.4	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE <i>C. PERFRINGENS</i> NAS AMOSTRAS DE INTESTINO DELGADO	58
4.5	PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA PARA DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC).....	63
4.5.1	Curva padrão.....	63
4.5.2	PCR em tempo real para quantificação do RNAm da toxina alfa de <i>Clostridium perfringens</i> das amostras de campo e quantificação celular de <i>Clostridium perfringens</i>	64
4.6	PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE RNAm DA TOXINA ALFA DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	67
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A- PROTOCOLO PARA PREPARO DO MEIO TAROZZI	95
	APÊNDICE B - PROTOCOLO PARA PREPARO DE MEIO SPS (COM 0,2% DE AZIDA SÓDICA)	96
	APÊNDICE C- PROTOCOLO PARA PREPARO DE agar sangue de carneiro 5% (COM 0,2% DE AZIDA SÓDICA)	97

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Clostridium perfringens* é comumente encontrada no trato gastrointestinal do homem e animais, assim como no solo e silagem, e sua patogenicidade está associada a várias toxinas. A espécie é geralmente classificada em 5 tipos toxinogênicos (A a E) (Quadro 1) com base na produção das toxinas letais principais: alfa, beta, épsilon e iota (HATHEWAY, 1990; ROOD; COLE, 1991).

Quadro 1 - Tipagem de *Clostridium perfringens* de acordo com a produção das toxinas

Toxinas Tipos	Alfa (α)	Beta (β)	Epsilon (ϵ)	Iota (ι)
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

A toxina alfa está presente em todos os tipos de *C. perfringens* e é codificada pelo gene cromossomal *cpa* ou *plc*, enquanto os genes das outras toxinas são plasmidiais (SONGER, 1996). A alfa toxina ou PLC tem atividade de fosfolipase C, sendo essencial para a virulência do microrganismo (KENNEDY et al., 2009), responsável pela citotoxicidade, necrose e hemólise observadas, resultando em indução de resposta inflamatória, contração do músculo liso, agregação plaquetária, choque, bradicardia e alta redução da função miocárdica culminando em morte (MÖLLBY, 1978).

A enterotoxemia é uma afecção resultante da difusão do *C. perfringens* e das toxinas produzidas pela bactéria por via sanguínea a partir do intestino (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; UZAL; SONGER, 2008), desencadeada por fatores que causam o desequilíbrio da microbiota intestinal como ingestão de níveis elevados de carboidratos, dietas ricas em proteína e pastagens luxuriantes (KRIEK et al., 1994). É um quadro comum em pequenos ruminantes, entretanto há pouca informação sobre a enterotoxemia em bovinos.

Enterotoxemia em bovinos é uma síndrome aguda ou peraguda classicamente descrita pelo observador do campo como “morte súbita” ou “animal encontrado morto”. Poucos indivíduos mostram sinais clínicos *antemortem* como dor

abdominal ou desordens nervosas (LEBRUN; MAINIL; LINDEN, 2010). A rápida putrefação do abdômen com produção de gás e um cheiro putrefeito é uma característica de infecções por clostrídeos. A lesão localizada mais tipicamente relatada é a jejunoileite necrohemorrágica aguda com espessamento da parede intestinal que se apresenta hemorrágica e necrosada (MANTECA et al., 2001).

Muito se lê sobre o papel da toxina alfa no processo de gangrena gasosa (SONGER, 1997; TITBALL, 1998), porém há muitos *gaps* no estudo do papel da toxina em doenças não gangrenosas do homem e animais. Muitas dessas doenças de animais nas quais se sugere que a toxina alfa tem um papel importante têm aumentado sua incidência e números de relatos. Ainda, seria essencial a determinação do mecanismo da regulação do gene *cpa* ou *plc*.

O desdobramento da etiologia das enterotoxemias causadas pelo *Clostridium perfringens* é difícil, pois é incerto se as mudanças nos níveis de *C. perfringens* no intestino são uma consequência da doença (ou da morte) ou uma causa verdadeira da condição (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). Além disso, são necessários mais dados sobre a ocorrência da bactéria em animais sadios para determinação do significado do isolamento de *C. perfringens* ou suas toxinas nos tecidos bovinos (VANCE, 1967).

Análises bacteriológicas quantitativas do conteúdo intestinal de casos típicos de enterotoxemia e uma comparação com outros casos de “morte súbita” para os quais o diagnóstico de enterotoxemia poderia ser excluído confirmam o fato de que a enterotoxemia bovina é caracterizada por um depósito da microbiota comensal do intestino delgado e do crescimento exacerbado de *C. perfringens* no local das lesões necrohemorrágicas (MANTECA et al., 2001). Segundo Manteca et al. (2001), *C. perfringens* está normalmente presente num nível de 10^2 a 10^5 UFC/mL de conteúdo intestinal mas pode alcançar níveis maiores do que 10^6 a 10^8 UFC/mL em casos de enterotoxemia.

A confirmação da enterotoxemia ainda permanece um problema para rotina de laboratórios de diagnóstico. Apenas uma determinação quantitativa do *C. perfringens* no conteúdo intestinal permite uma confirmação diagnóstica, como alternativa para simplificação do diagnóstico bacteriano, embora o *cutoff* permaneça discutível e varie de acordo com os autores (POPOFF, 1989; MANTECA et al., 2001).

Em 1997, Gibert et al. (1997) descreveram uma toxina desconhecida de *C. perfringens* e seu gene codificante originado de uma cepa isolada de um suíno com enterite necrótica. Inicialmente pensou-se que a toxina de 27, 6 KDa fosse um produto de digestão da toxina beta de 34,8 KDa, porém sua sequência de aminoácidos não mostrou homologia com a sequência da toxina beta ou com qualquer outra sequência protéica. Então a nova toxina foi denominada beta 2 ($\beta 2$) e seu gene *cpb2*, já que a atividade biológica desta toxina é similar à da beta (GIBERT; JOLIVET-RENAUD; POPOFF, 1997).

Além da proliferação celular do microrganismo, diferenças existentes na composição do gene e na produção da toxina alfa podem explicar parcialmente por que algumas cepas de *Clostridium perfringens* causam ou não doenças. Além disso, dados referentes à quantificação celular ou genética do microrganismo são muito variáveis, a começar pelas metodologias aplicadas, às regiões e raças estudadas. Níveis de genes expressos (por ex. RNAm) mudam diante de uma variedade de condições como a posição no ciclo celular ou sob exposição a drogas, hormônios, citocinas ou outros estímulos. Os métodos atualmente utilizados para quantificação do RNAm incluem técnicas baseadas em hibridização (ex. *Northern blotting*) e em amplificação de moléculas individuais de RNA combinando-se métodos de transcrição reversa e PCR (RT-PCR). Além da RT-PCR ter boa correlação com os métodos de hibridização, ela tende a ser mais sensível, pois amplifica exponencialmente pequenas quantidades de ácido nucléico. Avanços recentes na tecnologia da RT-PCR geraram o desenvolvimento de uma PCR quantitativa em tempo real. Essa reação incorpora uma tecnologia específica para detectar o produto de PCR após cada ciclo da reação. Várias metodologias estão disponíveis para detectar a geração de DNA pela PCR em tempo real incluindo as sondas de hibridização fluorogênicas (sistema TaqMan) e o corante Sybr Green que se liga a fitas de DNA dupla fita. A PCR em tempo real permite a detecção sensível do produto de DNA durante a faixa linear da amplificação, elimina a necessidade de análise pós-reação e incorpora *softwares* especializados para simplificar a análise dos dados (SCHMITTGEN et al., 2000).

Os objetivos deste estudo foram: avaliar as características dos isolados nacionais de *C. perfringens* quanto à sua presença, genotipo e quantidade em intestino delgado de ruminantes; presença do gene da toxina $\beta 2$ nos isolados nacionais; verificação e níveis de transcrição do gene da toxina alfa dos isolados em

casos bovinos e ovinos suspeitos de morte por enterotoxemia (Grupo Estudo) por *C. perfringens* comparados a um Grupo Controle composto por animais hígidos levados ao abate.

REVISÃO DA LITERATURA

---

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

O gênero *Clostridium* spp. consiste de um grupo diverso de bactérias gram-positivas que não crescem na presença de oxigênio e têm a habilidade de formar endosporos resistentes ao calor. Muitos destes anaeróbios são patogênicos tanto para o homem como para outros animais, e a maioria das doenças resultantes são mediadas pela produção de toxinas extracelulares potentes (ROOD; COLE, 1991).

Como esperado em um organismo responsável por tal variedade de condições patológicas, gerando desde uma intoxicação alimentar mediana até uma mionecrose fatal, a espécie *C. perfringens* produz pelo menos seis potenciais fatores de virulência, incluindo 12 toxinas (α a ν), enterotoxina e neuraminidase (sialidase). Muitos destes fatores de virulência são simples enzimas hidrolíticas secretadas pelo organismo como parte do seu papel saprofítico no solo, onde eles estão envolvidos provavelmente no processo de putrefação (ROOD; COLE, 1991).

A espécie *Clostridium perfringens* é comumente encontrada no trato gastrointestinal do homem e animais, assim como no solo e silagem. Sua patogenicidade está associada a várias toxinas. As toxinas alfa, beta, épsilon e iota são as principais substâncias venenosas letais produzidas pelo organismo, e estão bastante relacionadas com sua virulência, apesar de o microrganismo produzir várias toxinas extracelulares menores. Geralmente, o *C. perfringens* é classificado em 5 tipos toxinogênicos (A a E) com base na habilidade de produzir as toxinas letais principais (NILO, 1980; HATHEWAY, 1990) (Quadro 1 - Tipagem de *Clostridium perfringens* de acordo com a produção das toxinas).

Técnicas baseadas no DNA (PCR e hibridização) foram desenvolvidas para a tipagem de *C. perfringens* com a detecção dos genes das toxinas principais, e são uma metodologia alternativa ao de teste em animais de laboratório para detecção das toxinas. A presença do gene nem sempre está correlacionada com a síntese da proteína, embora apenas o gene *cpe* nas cepas de *C. perfringens* tipo E tenha se

mostrado silencioso. A genotipagem é confiável, prática e rápida e permite um resultado mais preciso e completo dos tipos de *C. perfringens* do que a toxinotipagem clássica (WIECKOWSKI et al., 1998 ¹apud PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999).

Duas outras toxinas principais (enterotoxina e beta-2) podem ser produzidas por todos os tipos de *C. perfringens*, embora não sejam utilizadas para sua tipificação (GARMORY et al., 2000). Cepas do tipo A, que produzem apenas a toxina alfa entre as toxinas principais, é um membro da microbiota normal de animais homeotérmicos e é recuperada do meio ambiente contaminado por fezes (CARTER; WISE, 1991). Entretanto, quando há potencial genético e em situações oportunas, o organismo pode causar gangrena gasosa, intoxicação alimentar e doença gastrointestinal no homem, enterite necrótica nas aves, enterites em suínos e abomasites, timpanismo e enterite hemorrágica em bovinos. Cepas dos tipos B-E são menos comuns no trato intestinal dos animais e podem ser encontradas ocasionalmente no meio ambiente em áreas onde a doença produzida por estes organismos é enzoótica (SONGER, 1996).

Com exceção da toxina i, que age intracelularmente, as toxinas de *C. perfringens* interagem com a membrana celular, levando à destruição da membrana e formação de poros. Todas as toxinas e enzimas hidrolíticas são secretadas, exceto a enterotoxina, que é liberada após a lise bacteriana durante o processo de esporulação (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999).

Clostridium perfringens possui um único cromossomo circular de aproximadamente 3,58 Mb, e os genes *plc* e *pfo* codificantes dos principais determinantes citotóxicos secretados pelo microrganismo estão localizados próximos à origem putativa da replicação (CANARD; COLE, 1989).

Vance (1967) realizou uma pesquisa da presença de *Clostridium perfringens* no trato alimentar de bovinos, sendo a identificação realizada pelos requerimentos atmosféricos para crescimento, morfologia colonial e observação de fermentação tumultuosa no leite. Assim, 202 de 399 amostras (50,62%) foram positivas para o microrganismo, com uma diferença estatisticamente significativa maior na quantidade de isolados do íleo do que em outros sítios como abomaso e cólon ($p < 0,05$). O autor

---

¹ WIECKOWSKI, E., BILLINGTON, S., SONGER, G., AND MCCLANE, B. *Clostridium perfringens* type E isolates associated with veterinary enteric infections carry silent enterotoxin gene sequences. **Zbl. Bakteriol. S29**, 407–408, 1998.

concluiu que o simples isolamento do microrganismo não tem significado diagnóstico pois muitos fatores, incluindo variação da permeabilidade dos tecidos, horas após a morte, sítios de isolamento, frequência de bacteremia terminal e a possibilidade da presença de esporos em tecidos normais, suportam as conclusões que devem ser pensadas quando o organismo é somente isolado.

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS PRINCIPAIS TOXINAS PRODUZIDAS POR *C. PERFRINGENS*

2.2.1 Toxina alfa (α)

A toxina α está presente em todos os tipos de *C. perfringens* e é codificada pelo gene cromossomal *cpa* ou *plc*, enquanto que os genes das outras toxinas (β , ϵ , ι e β_2) são plasmidiais (SONGER, 1996; TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). Diferentes cepas de *C. perfringens* produzem diferentes quantidades desta toxina, sendo as do tipo A, geralmente, as maiores produtoras (TSUTSUI et al., 1995; BULLIFENT et al., 1996). A alfa toxina ou PLC tem atividade de fosfolipase C e esfingomielinase, sendo essencial para a virulência do microrganismo (SONGER, 1997; KENNEDY et al., 2009), é responsável pela citotoxicidade, necrose e hemólise observadas (MÖLLBY, 1978) nos processos de enterotoxemia. A dose letal 50% para camundongos é de apenas 0,75 unidades, e entre os sintomas resultantes estão indução de resposta inflamatória, contração do músculo liso, agregação plaquetária, choque, bradicardia e alta redução da função miocárdica culminando em morte (MÖLLBY, 1978).

Esta toxina, a principal entre várias toxinas letais de *C. perfringens*, é produzida em quantidades variáveis por quase todos os isolados, sendo que a hemólise intravascular e dano capilar, agregação plaquetária e efeitos cardíacos no quadro de enterotoxemia são consistentes com a ação de uma toxina hemolítica em circulação (SONGER, 1997), porém ainda são necessários estudos definitivos na determinação do papel patogênico da toxina em doença entérica. Flores-Díaz et al.

(2004) relataram que o efeito citotóxico da PLC parece estar ligado à ruptura da membrana plasmática; entretanto, em baixas concentrações, a toxina perturba o metabolismo fosfolipídico e desregula vários sinais de processos de transdução, sendo que estes efeitos na citotoxicidade não estão claros mas a relevância deles em tecidos infectados por *C. perfringens* é notável. Estes efeitos causam uma disfunção nos contatos intercelulares nas células endoteliais e neutrófilos inibindo o tráfico de neutrófilos para o tecido infectado. Nas plaquetas, eles ativam eventos trombóticos o que melhora as condições para o crescimento anaeróbico, favorecendo então a disseminação da bactéria nos tecidos do hospedeiro.

Em geral, a toxicidade da fosfolipase tem sido ligada à atividade citolítica e presume-se que seja diretamente devido à atividade sobre os fosfolipídios de membrana e sua destruição (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SCHMIEL; MILLER, 1999), e tem sido tradicionalmente considerada um fator de virulência associado com o desenvolvimento da gangrena gasosa, intoxicação alimentar em humanos, enterotoxemias, enterites em animais domésticos e enterite necrótica nas aves (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999).

Morris et al. (2012), seguindo um protocolo de desafio de inoculação com as toxinas alfa e épsilon de *C. perfringens* tipo D em intestino delgado e cólon de bezerros, observaram o conteúdo intestinal mucoso e denso nas alças tratadas com a toxina alfa diferentemente do conteúdo transparente presente nas alças dos animais controle. Ao exame histopatológico, foi relatada a diminuição de vilosidades intestinais e o destacamento de células epiteliais e hemorragia da lâmina própria, sendo as lesões mais severas encontradas no intestino delgado. Ainda, bezerros de uma a quatro semanas de idades foram igualmente susceptíveis.

Em todos os tipos toxigênicos (A a E) de *C. perfringens*, o gene *plc* está situado no mesmo locus, próximo à origem putativa da replicação e entre dois operons de RNA ribossômico (CANARD et al., 1992). Essa localização é importante, uma vez que a região do cromossomo não é somente a primeira a ser replicada, mas também provavelmente é o segmento mais conservado do genoma, já que contém muitos “housekeeping genes”, refletindo a natureza essencial da toxina para a sobrevivência do *C. perfringens* (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999).

A análise da sequência de nucleotídeos do gene *plc* de 2,2 kb revelou uma região aberta de leitura da base 943 à 2137, codificando uma proteína com um peso molecular de 43,3 KDa. Os aminoácidos codificados entre o códon de iniciação e o

nucleotídeo 1027 formam uma sequência de sinal para o transporte direto da alfa toxina pela membrana celular (TITBALL et al., 1989). Leslie et al. (1989) confirmaram a presença de uma sequência de sinais para secreção da toxina.

Diferenças nos níveis de produção da toxina alfa parecem estar relacionadas à regulação transcricional do gene *cpa* (TSUTSUI et al., 1995). Apesar da possibilidade de a expressão de *cpa* ser estimulada *in vivo*, ainda devem ser identificados os mecanismos de regulação do gene *in vitro* (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999), e, embora o sítio regulatório da expressão do gene da toxina alfa ainda tenha que ser identificado, sequências de repetição poli-A acima da região -35 parecem exercer alguma função. Assim como muitas bactérias patogênicas, *C. perfringens* regula a expressão genética via um sistema composto por dois componentes identificado como sistema VirR/VirS (BA-THEIN et al., 1996). Neste sistema, VirS age como um sensor de histidina quinase, e em resposta a algum sinal ambiental desconhecido, fosforila VirR. E é proposto que essa fosforilação de VirR modula a transcrição de genes alvo (BA-THEIN et al., 1996). Experimentos de *microarray* identificaram que esse gene *vvr* modulado por esse sistema regula positivamente o *plc* (OHTANI et al., 2010). Estudos de deleção da região *vvr* sugeriram que a região codificante da proteína *vvr* não exerce função regulatória, indicando que essa seja derivada do próprio transcrito (identificado como VR-RNA) que funciona como uma molécula de RNA regulatória (SHIMIZU et al., 2002). De qualquer maneira, a identificação dos estímulos ambientais que modulam a função VirR/VirS poderia fornecer dados para o entendimento de como a expressão da toxina alfa é normalmente *downregulated* em intestinos de animais saudáveis e *upregulated* em algumas condições de doença (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999).

2.2.2 Toxina beta (β)

A toxina beta é codificada pelo gene plasmidial *cpb*, produzida por *C. perfringens* tipos B e C. Esta toxina de peso molecular 40 kDa é termolábil e sensível à tripsina (SAKURAI; DUNCAN, 1978). O seu mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido, entretanto, sabe-se que a toxina beta forma poros com seletividade para

cátions, como o sódio e o potássio em células susceptíveis (SHATURSKY et al., 2000). Já em células endoteliais de suínos, a toxina pode induzir necrose vascular, hemorragia e hipoxia do tecido necrosado (MICLARD et al., 2009).

A toxina beta produzida pelo *C. perfringens* tipo C é responsável por enterite necrótica em humanos e animais (HATHEWAY, 1990).

2.2.3 Toxina epsilon (ε)

Após a neurotoxina botulínica e a toxina tetânica, a toxina épsilon é a toxina mais potente produzida pelo gênero *Clostridium*. Esta toxina é codificada pelo gene *etx*, localizado em plasmídeos, e é produzida por cepas de *C. perfringens* tipos B e D (SONGER, 1996).

A toxina épsilon é secretada como uma prototoxina inativa, composta por 311 aminoácidos e com peso molecular de 34,25 KDa. A ativação desta ocorre por enzimas proteolíticas produzidas pelo próprio microrganismo, como as toxinas kappa ou lambda, ou por quebras proteolíticas que podem ocorrer no sistema gastrointestinal do hospedeiro, principalmente pela ação da tripsina e da quimiotripsina (SOLER-JOVER et al., 2004).

Esta toxina, quando presente no intestino, aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal, e se espalha para outros órgãos através do sistema circulatório, causando aumento na pressão sanguínea e na permeabilidade vascular, edema pulmonar, necrose hepática e edema nas meninges (SONGER, 1996; SOLER-JOVER et al., 2004).

A toxina épsilon produzida pelo *C. perfringens* tipos B e D é responsável pela enterotoxemia principalmente em ovinos e caprinos (SONGER, 1996).

2.2.4 Toxina iota (I)

A toxina iota é produzida apenas por cepas de *C. perfringens* tipo E (HATHEWAY, 1990). Esta toxina, diferentemente das outras toxinas produzidas por *C. perfringens*, é constituída por dois polipeptídeos, designados Ia e Ib que são codificados pelos genes *iap* e *ibp*, respectivamente, sendo ambos os genes plasmídeos. Para que a toxina iota apresente atividade biológica, é necessário que os componentes Ia e Ib sejam ativados, através de clivagem por ação de protease, além de ser necessário que ambos os componentes estejam presentes (STILES; WILKINS, 1986). Esta toxina também tem sido inferida na enterotoxemia em bovinos e outros animais jovens (POPOFF; STILES, 2005; MIYASHIRO; NASSAR; BALDASSI, 2009).

2.2.5 Enterotoxina (CPE)

A enterotoxina (CPE) é responsável por sintomas associados à intoxicação alimentar no homem por *C. perfringens* tipo A. Alguns estudos sobre a ação desta toxina indicam a ligação específica de CPE a receptores protéicos, inserção da toxina em membranas plasmáticas de mamíferos, e a formação de um complexo de 160 kDa entre a CPE e proteínas de membrana de mamíferos, cujas células irão desenvolver alterações na permeabilidade da membrana para moléculas pequenas (íons e aminoácidos) causando efeitos secundários que levam à morte celular (HANNA et al., 1992). Esta enfermidade apresenta como sintomas característicos náuseas, dores abdominais agudas e diarreia, sendo que esses sintomas se iniciam entre seis e 24 horas após o consumo do alimento contaminado. Normalmente, estas toxi-infecções são auto-limitantes, apresentando duração de aproximadamente 24 horas (BRYNESTAD; GRANUM, 2002), porém, em idosos e pacientes debilitados o quadro clínico pode ser mais severo.

Numa revisão sobre a enterotoxina de *C. perfringens*, McClane (1996) apontou alguns aspectos relacionados à expressão e genética do CPE.

Primeiramente, os isolados enterotoxigênicos representam apenas uma pequena fração (5%) da população global de *C. perfringens*, e há diferenças discerníveis mesmo dentro de uma pequena população de cepas *cpe*-positivas uma vez que o gene também varia sua localização (COLLIE; MCCLANE, 1998).

2.2.6 Toxina beta 2 (β 2)

Já que a patogenicidade e tipo de lesões se correlacionam com as principais toxinas elaboradas pela cepa de *C. perfringens*, a tipificação da bactéria em um dos cinco tipos A-E tem significado diagnóstico e epidemiológico. Foi suposto que a recentemente descrita toxina de 27,6 kDa fosse um produto de digestão da β toxina de 38,4 kDa, mas sua sequência de aminoácidos mostrou apenas 15% de homologia com a toxina β e nenhuma homologia significativa com outra proteína conhecida. Sendo assim, esta toxina codificada pelo gene *cpb2* foi chamada de β 2, já que possui atividade biológica similar à da toxina β (GIBERT; JOLIVET-RENAUD; POPOFF, 1997). Após a descrição do gene, o *cpb2* tem sido demonstrado por PCR em isolados de *C. perfringens* de uma variedade de animais com doenças entéricas (KLAASEN et al., 1999; DRAY, 2004).

Bueschel et al. (2003) reportaram a alta taxa de positividade de *cpb2* entre cepas de *C. perfringens* de leitões com enterite e a alta correlação do genótipo com o fenótipo, inferindo o papel importante da toxina beta 2 na patogenia destas infecções. Ainda segundo os autores, cepas de origem bovina *cpb2* positivas foram mais prevalentes em animais com enterite (21,4%) e em bezerros com enterite ou abomasite (47,3%) do que na população geral de bovinos. Manteca et al. (2002) implicaram a toxina beta2 na enterotoxemia bovina neonatal, sugerindo um sinergismo de ação entre as toxinas α e β 2 entre as amostras testadas.

2.2.7 Enterotoxemia

A enterotoxemia é uma afecção resultante da difusão do *C. perfringens* por via sanguínea, e da toxina produzida pela bactéria no intestino (POPOFF, 1989). Nos animais, o quadro de enterotoxemia é caracterizado por uma alta taxa de fatalidade provocando mortes súbitas, lesões de enterite hemorrágica do intestino delgado e, quase sempre, uma ausência de outros sinais clínicos (SONGER, 1996; POPOFF, 1989).

Uma das primeiras publicações referindo-se ao termo “morte súbita” foi descrita por Pierson et al. (1976). Eles examinaram animais que morreram subitamente, e essa classificação foi dada pelos observadores dos animais no campo sem sinais de doença *antemortem*, ressaltando-se que essa ausência pode simplesmente refletir uma incompleta ou inadequada observação. Esse estudo envolveu 32% de animais de um rebanho de 407.000 cabeças que morreram subitamente e concluiu-se que 47% dos casos foram devido à desordens respiratórias (apesar de que broncopneumonia não deveria ser incluída como uma causa de morte súbita); 22% resultado de timpanismo e acidose; 9% de enterite, 8% de acidentes, 4% de aneurismas pulmonares e outras, e 6% de causas indeterminadas. Retirando-se a broncopneumonia como causa de morte súbita do estudo, acidose e timpanismo seriam as causas mais comuns.

Enterotoxemia é uma doença comum em pequenos ruminantes, entretanto há pouca informação sobre a enterotoxemia bovina. No Brasil, Ferrarezi, Cardoso e Dutra (2008) tipificaram cepas de *C. perfringens* isoladas de bezerros com diarreia, porém não houve diferença estatística entre os grupos com e sem diarreia, tanto quanto à presença de *C. perfringens* ou um tipo específico de toxina detectado. Miyashiro, Nassar e Baldassi (2009) reportaram a tipagem molecular de 23 cepas de *C. perfringens* isoladas de casos de morte súbita em bovinos, o que revelou a frequência de 8,7% de tipo E, 8,7% de tipo D e a grande maioria (82,6%) de tipo A. Sabe-se que fatores que alteram o ambiente intestinal, como níveis elevados de carboidratos, dietas ricas em proteína e pastagens luxuriantes, podem resultar em abundante crescimento de *C. perfringens* e produção de toxinas (KRIEK; ODENDAAL; HUNTER, 1994) com o desencadeamento do quadro. Niilo e Avery (1963) relataram uma reprodução experimental da enterotoxemia em ruminantes e,

corroborando com as particularidades conhecidas das toxinas principais, nos animais inoculados com o tipo D os sintomas neurológicos foram predominantes (incoordenação motora, saltos, andar em círculos, convulsões e morte). Já os animais inoculados com filtrados do tipo A e tipo C, mesmo em grandes quantidades, falharam na reprodução da enterotoxemia.

As principais lesões macroscópicas encontradas nos animais mortos por enterotoxemia são: hemorragia de gravidade variada tanto na mucosa como na submucosa dos órgãos internos, conteúdo intestinal apresentando coloração amarronzada e com consistência serosa e pastosa (LOBATO; SILVA; ALMEIDA, 1998). O rumen e, frequentemente, o abomaso, estão repletos de alimentos. O íleo pode conter líquido em alguns de seus segmentos. Há excesso de líquido na cavidade abdominal, assim como no saco pericárdico. Petéquias hemorrágicas no epicárdio e no endocárdio, assim como nas membranas serosas, são bem aparentes. O fígado pode apresentar-se congesto e os pulmões edemaciados. Os rins podem estar congestos ou com pequenas hemorragias petequiais, mas não apresentam a degeneração típica (rim polposo) como é vista em casos de enterotoxemia dos ovinos (FILHO et al., 2009; MORRIS et al., 2012).

Morris et al. (2012) avaliaram o papel das toxinas alfa e épsilon no intestino de bovinos e observaram congestão nas alças tratadas com ambas as toxinas assim como o acúmulo de fluido no lumen, porém a descrição de muco hemorrágico foi encontrada apenas nas alças tratadas com a toxina épsilon. Suas observações indicaram que ambas as toxinas podem alterar a barreira intestinal em bovinos e são patogênicas para esta espécie.

2.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico de enterotoxemia muitas vezes depende da identificação das toxinas dos clostrídeos no intestino, e os tipos de *C. perfringens* podem ser diferenciados baseando-se na identificação das toxinas através de mecanismos como soroneutralização em camundongos. Contudo, estes testes não são muito

satisfatórios porque a sua produção é variável entre os clostrídeos e também porque as características das toxinas levam à ambiguidade na identificação. Além disso, algumas toxinas são extremamente lábeis e degradadas quase que instantaneamente após a morte. Outras são produzidas ou ativadas após a morte do animal (NILO, 1979).

O diagnóstico também pode ser baseado na detecção dos genes das toxinas por PCR (reação em cadeia pela polimerase) que, além de substituir o uso de animais, também reduz custo e tempo (ALBINI et al., 2008). A PCR provou ser uma ferramenta confiável e os experimentos de rotina para diagnóstico de *C. perfringens* têm utilizado o sistema de multiplex PCR para os genes de várias toxinas na mesma reação (MEER; SONGER, 1997; BAUMS et al., 2004).

Métodos moleculares como a PCR permitem a tipagem de *C. perfringens* através da detecção dos genes *cpa*, *cpb* e *etx*, codificadores das toxinas alfa, beta e épsilon, respectivamente e dos genes, *iap* e *ibp*, codificadores da toxina iota (MEER; SONGER, 1997; BAUMS et al., 2004).

Com a aplicação da técnica de PCR a partir dos isolados, gerou-se uma ambiguidade com relação aos resultados em bioensaio, levantando sérios questionamentos sobre a real participação dos tipos C e D de *Clostridium perfringens*. Entretanto, Lobato et al. (2006) descreveram um quadro de enterotoxemia em bovino comprovando a detecção da toxina épsilon no conteúdo intestinal por soroneutralização em camundongos, e a confirmação do envolvimento do tipo D de *C. perfringens* por PCR a partir do isolado.

A PCR também possibilita detectar cepas de *C. perfringens* potencialmente enterotoxigênicas, ou seja, cepas portadoras do gene *cpe*, codificador para enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) (WEN; MCCLANE, 2004).

Em aves, há vários estudos sobre cepas de *C. perfringens* tipo A envolvidas em quadros de enterite necrótica, indicando que é rara a ausência do microrganismo na microbiota normal desta espécie. Contudo, o número de *C. perfringens* estimado é extraordinariamente variável (STUTZ; LAWTON, 1984; KNARREBORG et al., 2002).

Há forte evidência de que cepas do tipo A são as principais envolvidas no quadro de enterotoxemia bovina. Porém, dentro do tipo A, é provável que outras toxinas além da toxina alfa contribuam para o processo patofisiológico como, por exemplo, a toxina beta2 (LEBRUN; MAINIL; LINDEN, 2010).

A PCR constitui-se em uma técnica muito eficaz para produzir grandes quantidades de fragmentos amplificados de DNA a partir de uma pequena concentração de um DNA ou cDNA (DNA complementar) molde presente em uma amostra inicial. Na técnica convencional de PCR, para detecção e análise dos fragmentos amplificados de DNA, é necessária a realização da separação eletroforética dos produtos amplificados seguindo-se da avaliação visual ou densitométrica das bandas resultantes após incidência de luz ultra-violeta. O advento do método de PCR quantitativa em tempo real trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta de diagnóstico ainda mais rápida do que a técnica de PCR convencional. A diferença básica entre a reação de PCR convencional e a em tempo real é que esta última ocorre em um sistema fechado e é monitorada através de um programa computacional que avalia a evolução da técnica por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Essa fluorescência pode ser gerada pela ligação do Sybr Green com fitas duplas de DNA, porém ele não distingue diferentes DNAs de fita dupla. Nesta metodologia o produto específico, produtos inespecíficos e dímeros de *primers* são detectados igualmente, ou seja, qualquer artefato contribui com a intensidade do sinal, o que pode resultar na super estimativa da concentração da sequência alvo. Assim sendo, para determinar se apenas o produto de PCR específico foi amplificado, nesse tipo de sistema gera-se uma curva de *melting* após a PCR. A caracterização do produto de PCR através da análise desta curva é baseada no fato de que cada molécula de fita dupla de PCR tem a sua temperatura de *melting* característica (T_m), na qual 50% do DNA encontra-se como fita dupla e 50% está desnaturado ou como fita simples. Então, durante uma corrida da curva de *melting*, a reação é lentamente aquecida a 95°C, o que causa a desnaturação da fita dupla de DNA e uma diminuição rápida da fluorescência do Sybr Green quando alcança a temperatura de T_m de um produto de PCR presente na reação. Se a PCR tiver gerado apenas um amplicon, a análise da curva de *melting* mostrará apenas um pico de *melting* (BUSTIN et al., 2009).

Além do método de PCR em tempo real baseado no uso de corantes intercalantes como o Sybr green, há também a tecnologia de sondas. Ambas as metodologias podem fornecer resultados excelentes e cada uma tem suas vantagens e desvantagens: as sondas permitem a quantificação de reação de multiplex enquanto que os corantes intercalantes são a escolha de melhor custo-

benefício, especialmente quando um número limitado de amostras será avaliado (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Os níveis de expressão dos genes podem ser medidos por PCR em tempo real quantitativa relativa ou absoluta. A quantificação absoluta relaciona o sinal da PCR para prever o número de cópias comparando-a com uma curva padrão, enquanto que a quantificação relativa mede a mudança relativa na expressão do RNAm (SCHMITTGEN et al., 2000). Essa metodologia mede a expressão do gene alvo em comparação com o gene de referência utilizando-se um calibrador (DHANASEKARAN; DOHERTY; KENNETH, 2010). Independente do método, um fator chave na habilidade quantitativa da PCR em tempo real é a medição do produto do gene alvo dentro da faixa linear da reação de amplificação. O *endpoint* da análise da PCR em tempo real é o ciclo do limiar onde o sinal gerado pela reação de PCR foi detectado primeiramente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; WHELAN; RUSSELL; WHELAN, 2003). Bustin et al. (2009) propuseram uma padronização de nomenclaturas utilizadas nos procedimentos de PCR em tempo real, sendo uma delas o uso de Cq (*quantification cycle*) para descrever o ciclo da PCR utilizado para a quantificação genética baseando-se no fato de que os termos Ct (*threshold cycle*), Cp (*crossing point*) ou TOP (*take-off point*) correntemente utilizados nos trabalhos atuais referem-se ao mesmo valor, variando de acordo com o fabricante do equipamento por razões de diferenciação de produto, e não por precisão ou clareza da reação.

É sabido que o impacto da qualidade do RNA na estabilidade da expressão dos genes de referência interfere na comparação entre amostras, sendo necessário o controle da qualidade anteriormente aos procedimentos da PCR em tempo real quantitativa. Além da pureza e integridade, a amostra de RNA deve estar livre de contaminação por DNA e o tratamento com DNase é a estratégia mais eficiente (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). PCR em tempo real é a técnica mais sensível e mais flexível dos métodos de quantificação de DNA ou cDNA podendo ser utilizada para comparar níveis de RNAm de diferentes populações de amostras, para caracterizar padrões de expressão de RNAm, para discriminar entre RNAm relacionados e para analisar estruturas de RNA (BUSTIN, 2000).

Alguns meios estão disponíveis para o isolamento seletivo de *Clostridium perfringens*. Estes meios são similares nos seus modos de ação baseando-se na habilidade do *C. perfringens* em reduzir sulfito à sulfeto, produzindo então colônias

enegrecidas. Como muitos outros organismos (p.ex. *Enterobacteriaceae*) têm a habilidade de reduzir sulfitos, é necessária a adição de agentes seletores incorporados nesses meios para suprimir o crescimento competitivo. Entre os meios mais empregados estão o SPS (sulfito-polimixina-sulfadiazina), SFP (Shahidi-Ferguson *perfringens*), TSC (triptose-sulfito-cicloserina) e TSN (triptose-sulfito-neomicina). O SPS incorpora dois antibióticos para suprimir o crescimento de organismos da família *Enterobacteriaceae* e muitos outros anaeróbios facultativos, incluindo cepas de *Pseudomonas* e *Bacillus* spp. O agar TSN mostrou inibir algumas cepas de *C. perfringens*. Já o agar SFP é excelente para a recuperação quantitativa de *C. perfringens*, porém menos sensível se comparado aos outros dois meios. HARMON et al. (1971) concluíram que não há diferenças na recuperação de células vegetativas de *C. perfringens* entre os meios SPS e SFP, porém o preparo do SPS é mais simples. Por essas razões, o presente trabalho optou por utilizar o agar SPS e metodologia de “pour-plate” para quantificação do *C. perfringens* em amostras de intestino delgado acrescido de 0,2% de azida sódica para maior inibição de crescimento das enterobactérias (MARY JO ZIMBRO; POWER, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

---

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram processadas 61 amostras de conteúdo de intestino delgado de bovinos e 12 de ovinos encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico durante o período de Agosto de 2010 a Abril de 2012, com histórico sugestivo de enterotoxemia com morte súbita precedida ou não de quadro gastrointestinal e/ou sintomatologia nervosa. Os animais eram provenientes de vários Estados: São Paulo, Paraná, Tocantins, Espírito Santo, Roraima, Bahia, Mato Grosso, Ceará, Maranhão, Alagoas, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Foram analisados apenas conjuntos de amostras que continham intestino delgado e, ainda, com quantidade de conteúdo intestinal disponível para realização completa das metodologias, além de bom estado de conservação. As amostras que não apresentaram todas essas características foram descartadas do estudo.

Paralelamente para o grupo controle, foram colhidas e processadas 73 amostras de conteúdo de intestino delgado de bovinos saudáveis levados ao abate e 24 de ovinos saudáveis levados ao abate (grupo controle) em dois abatedouros do Estado de São Paulo e em quatro diferentes dias de colheita.

A seguir, o fluxograma resumindo os procedimentos aplicados (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - Resumo dos procedimentos aplicados nas amostras de intestino delgado

Fonte: MIYASHIRO, S., 2013

3.1 QUANTIFICAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Para quantificação de *Clostridium perfringens* foi utilizada a metodologia tradicional para contagem em placas, resumidamente descrita a seguir (adaptada de [BRASIL, 2003]):

- ✓ suspender 2-20 g de conteúdo do intestino delgado com ou sem lesões macroscópicas (preferencialmente porção íleo) em volume 9 vezes maior de solução salina 0,85% (diluição 10^{-1})
- ✓ realizar diluição seriada na base 10 de cada homogenato até a diluição 10^{-7}
- ✓ semear alíquotas de 1 mL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-7}) em placas estéreis e adicionar cerca de 13 mL de ágar SPS (sulfito-polimixina-sulfadiazina) (Apêndice B) com azida sódica em temperatura de 46°C-48°C
- ✓ homogeneizar cuidadosamente e deixar solidificar em superfície plana
- ✓ adicionar uma segunda camada de cerca de 10 mL do mesmo meio e deixar solidificar em superfície plana
- ✓ imediatamente após a solidificação do ágar, incubar as placas (sem inverter) em câmara de anaerobiose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas
- ✓ selecionar placas que contenham entre 20 e 200 colônias típicas (enegrecidas)
- ✓ contar todas as colônias negras presentes e anotar o resultado
- ✓ esse resultado multiplicado pelo inverso da diluição usada para contagem corresponde ao número de unidades formadoras de colônia de *Clostridium* sulfito redutores presentes por grama da amostra em análise

O esquema a seguir elucida e ilustra a metodologia aplicada para quantificação de *Clostridium perfringens* nas amostras de intestino delgado (Esquema 1).

Esquema 1 - Metodologia para quantificação de *Clostridium perfringens* nas amostras de intestino delgado

Fonte: MIYASHIRO, S., 2013

Leitura das placas após o período de incubação: observar a diluição que apresentou de 20 a 200 UFC

Fonte: MIYASHIRO, S., 2013

A confirmação para *Clostridium perfringens* foi realizada molecularmente seguindo a reação descrita no próximo item.

3.2 ISOLAMENTO E TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

A diluição 10^{-1} de cada amostra de intestino delgado foi também inoculada em caldo Tarozzi (Apêndice A) (Foto 1) incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas, e, após a verificação de produção de gás no meio (deslocamento do anel de vaselina), inoculou-se 10 μl em placa contendo agar sangue de carneiro 5% com 0,2% de azida sódica (Apêndice C) (para inibição do crescimento de coliformes), incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas em condições de anaerobiose (jarra MacIntosh) como descrito anteriormente. Paralelamente, uma outra alíquota foi semeada em placa contendo o mesmo meio de cultura porém mantida a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições de aerobiose.

Após o período de incubação as placas foram analisadas para pesquisa de colônias originadas apenas em condições de anaerobiose apresentando beta ou dupla hemólise (Foto 2).

Colônias típicas identificadas foram suspensas em aproximadamente 100 µl de água livre de nucleases para confirmação da espécie *Clostridium perfringens* e tipagem molecular. Essa suspensão serviu como DNA molde para a PCR realizada posteriormente.

Foto 1 - Meio Tarozzi

Fonte: MIYASHIRO, S., 2013

Foto 2 - Colônias de *Clostridium perfringens* apresentando dupla hemólise

Fonte: MIYASHIRO, S., 2013

As amostras de DNA foram submetidas ao protocolo de amplificação de DNA para confirmação da espécie através da detecção do gene das toxinas α (900 pb) (BAUMS et al., 2004), e concomitante tipificação pela detecção das toxinas β (196 pb), ϵ (655 pb) e ι (446 pb) (MEER; SONGER, 1997), todos utilizados em reação de multiplex-PCR com os *primers* descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - *Primers* utilizados para tipagem de *Clostridium perfringens*

Gene toxina	Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho fragmento	Referência
α	cpa 5L	AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA	900 pb	Baums et al., 2004
	cpa 5R	TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC		Baums et al., 2004
β	cpb F	GCG AAT ATG CTG AAT CAT CTA	196 pb	Meer e Songer, 1997
	cpb R	GCA GGA ACA TTA GTA TAT CTT C		Meer e Songer, 1997
ϵ	etx F	GCG GTG ATA TCC ATC TAT TC	655pb	Meer e Songer, 1997
	etx R	CCA CTT ACT TGT CCT ACT AAC		Meer e Songer, 1997
ι	i F	ACT ACT CTC AGA CAA GAC AG	446 pb	Meer e Songer, 1997
	i R	CTT TCC TTC TAT TAC TAT ACG		Meer e Songer, 1997

Em cada reação foram misturados 10 μ L do DNA extraído, 25 pmol de cada *primer* anteriormente citado, 200 μ M de cada nucleotídeo, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris Hcl (pH 9,0), 2mM de $MgCl_2$ e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), perfazendo um volume total de 50 μ L. Foram utilizados 30 ciclos de amplificação, consistindo de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 53°C para hibridização e 1 minuto a 72°C para extensão. Após o último ciclo, foi adicionado um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

As PCRs foram realizadas em termocicladora BioRad® e a leitura das reações em gel de agarose 1% (Invitrogen) corado com Sybr Safe (Invitrogen) nas condições especificadas pelo fabricante (1 μ L de Sybr Safe para cada 100 mL de gel de agarose) a 6-7 V/cm (distância entre os eletrodos da cuba de eletroforese) em ambiente escuro. Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido à luz UV e a imagem captada por sistema fotodocumentador.

3.3 PESQUISA DO GENE DA TOXINA B2

As suspensões de DNA molde descritas no item anterior foram também submetidas a outra PCR para detecção do gene *cpb2* (567 pb) (GARMORY et al., 2000) descrita a seguir.

Quadro 3 - Sequência de *primers* utilizados para detecção do gene da toxina $\beta 2$

Primer	Sequência (5'→3')
cpb2 F	AGA TTT TAA ATA TGA TCC TAA CC
cpb2 R	CAA TAC CCT TCA CCA AAT ACT C

Em cada reação foram misturados 10 μ L do DNA extraído, 25 pmol de cada *primer* (Quadro 3), 200 μ M de cada nucleotídeo, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl (pH 9,0), 2mM de $MgCl_2$ e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), perfazendo um volume total de 50 μ L. Foram utilizados 30 ciclos de amplificação, consistindo de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 40 segundos a 53°C para hibridização e 40 segundos a 72°C para extensão. Após o último ciclo, foi adicionado um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foi utilizado o mesmo equipamento termociclador e as mesmas condições de leitura expostas no item anterior.

3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO RNAm DA TOXINA ALFA

Após o isolamento de *Clostridium perfringens*, foram selecionadas de 5 a 10 colônias características com hemólise e crescimento exclusivo em anaerobiose, repicadas para tubos com 3 mL de caldo BHI e incubados em câmara de anaerobiose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foram transferidos 1,5 mL para microtubo e centrifugado a 12000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e, ao precipitado, foram adicionados 300 μ L de RNA later® (Ambion) para preservação do RNA. Foram mantidos a -80°C até o momento do processamento para extração de RNA.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE RNAm DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC)

Para avaliação indireta da expressão do gene *plc*, realizou-se a seguinte metodologia para quantificação do RNAm do gene *plc* que codifica a toxina alfa de *Clostridium perfringens*:

- ✓ Extração de RNA total (Trizol®) dos isolados de *C. perfringens* mantidos em caldo BHI a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas em anaerobiose
- ✓ Transcrição reversa a partir de 100 ng de RNA total
- ✓ PCR convencional com *primers* cpa-R e cpa-F
- ✓ PCR em tempo real com *primers* cpa-R e cpa-F (sistema Sybr Green)

3.5.1 Extração de RNA

A alíquota dos isolados mantida em RNA later (Ambion®) foi utilizada para extração de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen®) segundo normas do fabricante, como descrito a seguir:

- ✓ Adicionar 300 µl de nuclease free-water (Ambion®) ao isolado com RNA later®, homogeneizar em vortex e centrifugar (Centrífuga refrigerada Eppendorf®) a 13000 xg a 4°C por 15 minutos, descartar o sobrenadante.
- ✓ Ressuspender o pellet em 250 µl de nuclease free water e 750 µl de TRIZOL. Homogeneizar em vortex até total suspensão do pellet.
- ✓ Incubar as amostras por 10 minutos à temperatura ambiente.
- ✓ Adicionar 200 µl de clorofórmio (Synth®) e homogeneizar vigorosamente por 30 segundos em vortex
- ✓ Incubar à temperatura ambiente por 5-10 minutos
- ✓ Centrifugar a 12000xg / 15 minutos / 4°C
- ✓ Transferir 400 µl da fase aquosa para um tubo novo
- ✓ Adicionar 500 µl de isopropanol (Synth®) e homogeneizar por inversão

- ✓ Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos
- ✓ Centrifugar a 12000xg / 10 minutos / 4°C
- ✓ Retirar o sobrenadante com o máximo de cuidado para não aspirar o pellet
- ✓ Lavar o pellet com 1ml de etanol 75% gelado
- ✓ Centrifugar a 12000xg / 2-5 minutos / 4°C
- ✓ Retirar o sobrenadante com o máximo de cuidado para não aspirar o pellet
- ✓ Lavar o pellet com 1 ml de etanol absoluto (Synth®) gelado
- ✓ Centrifugar a 12000xg / 2-5 minutos / 4°C
- ✓ Retirar o sobrenadante com o máximo de cuidado para não aspirar o pellet
- ✓ Deixar o tubo aberto à temperatura ambiente por 5 minutos até secagem do etanol
- ✓ Ressuspender o pellet em 30 µl de água livre de nucleasse
- ✓ Remoção de DNA genômico residual com 15 unidades de DNaseI (Life Technologies®) por 10 minutos a 37°C seguidos de 5 minutos a 90°C
- ✓ A suspensão final de RNA total foi armazenada a -80°C até o momento da transcrição reversa

Para mensuração da concentração de RNA total extraído e avaliação da qualidade e pureza pelo cálculo da razão das absorbâncias 260/280, foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®). As amostras que resultaram em valores diferentes de 1,8-2,0 foram re-extraídas antes da transcrição reversa.

3.5.2 Transcrição reversa com *primers* randômicos

Para a síntese de cDNA foram utilizados 100 ng do RNA total extraído de cada amostra submetidos à reação de transcrição reversa utilizando-se a enzima MMLV (Invitrogen) com o protocolo descrito a seguir:

- ✓ A um microtubo de 200 µl, acrescentar o RNA total extraído diluído a 5 ng/µL (20 µL)
- ✓ Para desnaturação do RNA, incubar os microtubos em termobloco a 95°C/ 5 minutos, e após o período incubá-los imediatamente em gelo por 10 minutos
- ✓ Preparar o Mix para RT contendo 8µL de 5x First Strand Buffer, 4 µL de dNTP a 10 mM, 4 µL DTT, 2 µL MMLV, 2 µL *primers* randômicos a 50 ng/ µL (Invitrogen)

- ✓ Acrescentar 18,4 µL do mix ao tubo com o RNA desnaturado
- ✓ Incubar as amostras em termociclador BioRad® seguindo o ciclo: 25° C por 10 minutos, 37°C por 1 hora, 70°C por 15 minutos.

3.5.3 Transcrição reversa com *primer* específico

Para a síntese de cDNA foram utilizados 100 ng do RNA total extraído de cada amostra submetidos à reação de transcrição reversa utilizando-se a enzima MMLV (Invitrogen) e o primer anti-sense cpa-R-RT com o protocolo descrito a seguir:

- ✓ A um microtubo de 200 µl, acrescentar o RNA total extraído diluído a 5 ng/µl (20 µl)
- ✓ Para desnaturação do RNA, incubar os microtubos em termobloco a 95°C/ 5 minutos e após o período incubá-los imediatamente em gelo por 10 minutos
- ✓ Preparar o Mix para RT contendo 8µL de 5x First Strand Buffer, 4 µL de dNTP a 10 mM, 4 µL DTT, 2 µL MMLV, 0,4 µL *primer* cpa-R a 10 mM. Acrescentar 18,4 µL do mix ao tubo com o RNA desnaturado
- ✓ Incubar as amostras em termociclador BioRad® seguindo o ciclo: 37°C por 1 hora, 70°C por 15 minutos

3.5.4 Quantificação da transcrição do gene *p/c* (qPCR)

Para quantificação da transcrição do gene *p/c* primeiramente foi sintetizada a curva padrão da reação de PCR em tempo real com o plasmídeo clonado e posteriormente a aplicação da mesma nas amostras de cDNA. Paralelamente, as amostras de cDNA também foram avaliadas qualitativamente pela PCR convencional.

3.5.5 Curva padrão

Para desenho da curva padrão da reação de PCR quantitativa, o fragmento do gene da PLC amplificado com os *primers* específicos foi clonado em plasmídeo pGem-T easy.

3.5.5.1 Amplificação de DNA de amostra de *C. perfringens* e clonagem

Um isolado de *C. perfringens* (121/12) foi submetido à PCR com *primers* descritos por Meer e Songer (1997) (Quadro 4) para amplificação de fragmento do gene PLC nas mesmas condições de ciclo descritas no item 3.2. Após a amplificação o produto de PCR foi purificado com o kit QIAquick PCR Purification kit (Qiagen®).

Quadro 4 - Sequência de *primers* utilizados para amplificação de fragmento do gene da toxina α para desenho da curva padrão

Primer	Sequência (5'→3')
cpa F	GCT AAT GTT ACT GCC GTT GA
cpa R	CCT CTG ATA CAT CGT GTA AG

A amplificação resultou em produtos com *overhang* na extremidade 3' de uma adenina, adicionada pela enzima *Taq* polimerase. Através desta, o produto pôde ser ligado em pGEM-T Easy (Promega), o qual contém um *overhang* de timina nas extremidades 3' (Figura 1).

Figura 1 - Representação do vetor de clonagem pGEM-T Easy, ressaltando as enzimas de restrição no sítio múltiplo de clonagem. Amp^r - gene de resistência a ampicilina; Ori- origem de replicação; Lac Z – operon lac

Fonte: Manual pGEM-T-Easy (Promega ®)

A ligação dos insertos ao vetor de clonagem foi realizada com o kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Alíquotas de 3,5 µL do produto de PCR purificado obtido no item anterior foram misturadas com 0,5 µL do vetor pGEM-TEasy (50 ng/µL), 3 unidades da enzima T4 DNA ligase e 5 µL de tampão de ligação 2X, mantendo-se a reação a 4°C por aproximadamente 16 horas.

A transformação de *Escherichia coli* DH5-α competentes, via eletroporação, foi realizada segundo o protocolo descrito por (AUSUBEL et al., 1998).

A seleção dos transformantes foi feita em LB ágar contendo ampicilina (100 µg/mL), suplementado com IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo, indutor do operon Lac de *E. coli*) e X-gal (5-bromo-4cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosídeo, substrato para a enzima β-galactosidase). Colônias transformadas contendo plasmídeo sem inserto puderam ser diferenciadas devido à sua coloração azul.

A confirmação da clonagem foi realizada através de PCR das colônias utilizando-se os primers T7 e SP6, que flanqueiam a região de clonagem no vetor pGEM-T Easy.

Os clones transformados foram cultivados por 16 horas em meio LB e os plasmídeos foram extraídos através de miniprep com o kit Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf®).

Posteriormente, o cálculo de número de cópias foi estimado a partir da concentração do clone (inserto + plasmídeo) utilizando-se a fórmula descrita a seguir:

$$\text{Cópias de plasmídeos}/\mu\text{L} = \frac{X \text{ g}/\mu\text{L DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{Y \times 660}$$

Onde: X é a concentração em g/ μL do plasmídeo clonado e Y é o comprimento do plasmídeo clonado em pares de base (pb)

Para avaliação da sensibilidade analítica das reações e definição da curva padrão da PCR em tempo real, procedeu-se a diluição seriada do plasmídeo clonado obtendo-se as seguintes diluições: 10^{10} cópias/5 μL , 10^9 cópias/5 μL , 10^8 cópias/5 μL , 10^7 cópias/5 μL , 10^6 cópias/5 μL , 10^5 cópias/5 μL , 10^4 cópias/5 μL , 10^3 cópias/5 μL , 10^2 cópias/5 μL , 10^1 cópias/5 μL , 10^0 cópias/5 μL .

3.5.6 PCR em tempo real

A quantificação por PCR em tempo real foi realizada em equipamento Light Cycler 480 (Roche®) de acordo com o protocolo descrito por Si et al. (2007) utilizando-se os *primers* específicos para a toxina α descritos por Meer e Songer (1997) com Master Mix com princípio Sybr Green (Roche®) seguindo ciclo de temperaturas adaptados de Si et al. (2007).

O cDNA (5 μL) foi adicionado a 20 μL de uma mistura de reação com 1X Master mix e 7,5 pmol de cada *primer* (Quadro 4). O ciclo de programas empregado foi de 10 min a 95°C, então 45 ciclos de 95°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e finalmente 72°C por 2 minutos. A fluorescência foi detectada após cada etapa de hibridização. Para confirmar a especificidade da reação, após o ciclo de amplificação foi realizada a curva de dissociação (curva de *melting*) nas condições: 95°C por 5 segundos, 65°C por 1 minuto e 95°C no modo de

aquisição contínuo a cada 2°C. O gene recombinante *cpa* nas concentrações de 10^0 a 10^8 cópias foi adicionado para desenho da curva padrão.

Para verificação da repetibilidade da técnica cada amostra foi analisada em duplicata em cada ensaio, e para a reprodutibilidade, o ensaio foi repetido em três dias distintos (ou dois para algumas amostras).

No equipamento Light Cycler 480 (Roche®) utilizado para as reações, há a opção de salvar a curva padrão (curva padrão externa) e, a cada nova placa exposta ao mesmo protocolo de reação, a validação da mesma é feita adicionando-se pelo menos um ponto da curva padrão externa.

3.6 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC)

A qualificação da presença de RNAm do gene *p/c* foi realizada através de PCR do cDNA como descrito no item 3.5.5.1 (Quadro 4).

RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

A Tabela 1 e Gráfico 1 a seguir resumem os resultados relativos ao isolamento de *Clostridium perfringens* de acordo com a quantidade de amostras analisadas durante o período provenientes de animais com alguma suspeita de enterotoxemia (Grupo Estudo) e do Grupo Controle composto por amostras de intestino delgado de animais hígidos levados ao abate.

Tabela 1 - Resultados do isolamento de *C. perfringens* nos Grupos Estudo e Controle

ESPÉCIE ANIMAL	GRUPOS	QUANTIDADE TOTAL DE AMOSTRAS	ISOLAMENTO CP POSITIVO	ISOLAMENTO CP NEGATIVO
Bovina	Estudo	61	29 (47,54%)	32 (52,46%)
	Controle	73	0 (0%)	73 (100%)
Ovina	Estudo	12	4 (33,33%)	8 (66,67%)
	Controle	24	5 (20,83%)	19 (79,17%)
TOTAL	Estudo	73	33 (45,20%)	40 (54,80%)
	Controle	97	5 (5,15%)	92 (94,85%)

Gráfico 1 - Resultados referentes à porcentagem de isolamento de *C. perfringens* nos grupos Estudo e Controle de bovinos e ovinos

Foi realizada análise de sazonalidade de isolamento do microrganismo de acordo com a data de entrada no Laboratório (Agosto 2010 a Abril 2012) nas amostras do Grupo Estudo de Bovinos, como ilustrado no Gráfico 2 a seguir.

Gráfico 2- Representação da distribuição de recebimento de amostras de animais com suspeita de enterotoxemia onde foi isolado o microrganismo

Sendo a amostragem de conveniência, a disponibilidade das mesmas depende do interesse do solicitante pelas análises. Apesar disso, pode-se notar a presença de alguns picos variando de ano para ano.

Poucas informações sobre sexo, raça, idade e sintomatologia observada puderam ser levantadas dentro do grupo estudo, contudo seguem alguns dados disponíveis referentes aos animais em que se isolou *C. perfringens* salientando-se que não foi possível traçar grandes conclusões a respeito destes quesitos por serem informações dispersas:

- ✓ Ovinos: um animal de 5 anos que apresentou sintomatologia nervosa (pedalagem) 12 horas antes do óbito e um animal recém-nascido que morreu subitamente sem sintomas prévios. Ambos apresentaram quantificação de 10^3 UFC/g de *C. perfringens*.
- ✓ Bovinos: 7 animais de 1 dia a 1,5 ano (2 com quantidades de 10^1 UFC/g, 2 com 10^3 UFC/g, um com 10^4 UFC/g e dois com 10^5 UFC/g). Nessa faixa etária, um dos animais apresentou diarreia e outro com fator predisponente relatado de morte rápida após manejo estressante para troca de curral. Entre 1,5 ano e 3 anos, dois animais apresentaram contagens celulares de 10^3

UFC/g, um de 10^6 UFC/g, um de 10^7 UFC/g e um de 10^8 UFC/g. Neste grupo, dois animais apresentaram diarreia com sangue e outro incoordenação motora. Houve um caso onde o fator predisponente relatado foi a superalimentação. Na faixa etária adulta (>3 anos) foram observadas quantificações de um animal com 10^3 UFC/g, dois animais com 10^4 UFC/g, um 10^6 UFC/g e um 10^7 UFC/g. Neste grupo houve dois relatos de episódios de diarreia e outros dois com quadro de incoordenação motora e pedalagem.

A análise estatística comparando-se o isolamento de *C. perfringens* entre os grupos estudo e controle mostrou diferença estatisticamente significativa nos bovinos ($p=0,0001$, teste de Fischer).

4.2 TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *C. PERFRINGENS*

Após o isolamento do microrganismo, todos os isolados foram tipificados pela PCR como *Clostridium perfringens* tipo A (100%), ou seja, positivas apenas para o gene da toxina α .

4.3 DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA B2

A pesquisa do gene da toxina β_2 nos isolados de *C. perfringens* resultou nos dados expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da detecção do gene da toxina $\beta 2$ nos isolados de *Clostridium perfringens*

ESPÉCIE ANIMAL	GRUPO	TOTAL	DETECÇÃO $\beta 2$	AUSÊNCIA $\beta 2$
Bovina	Estudo	29	15 (51,73%)	14 (48,27%)
	Controle	0	0	0
Ovina	Estudo	4	3 (75%)	1 (25%)
	Controle	5	5 (100%)	0
TOTAL	Estudo	33	18 (54,54%)	15 (45,45%)
	Controle	5	5 (100%)	0

Como não houve isolamento de *C. perfringens* no grupo controle de bovinos e a amostragem de ovinos foi muito baixa, não foi possível traçar conclusões sobre a importância do gene *cpb2* nessas espécies animais como fator de risco, e em ambas espécies nota-se a ampla distribuição entre os isolados tanto no grupo controle de ovinos (100%) quanto nos grupos estudo (54,54%).

4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE *C. PERFRINGENS* NAS AMOSTRAS DE INTESTINO DELGADO

Todas as amostras de intestino delgado do grupo controle de bovinos (n=73) resultaram em quantidades <10 UFC/g de *C. perfringens*, e ausência de isolamento do microrganismo. No grupo estudo de bovinos (n=61) seguem os resultados referentes a quantificação de *C. perfringens* encontrados: 38 amostras com valores <10 UFC/g (62,3%), 3 amostras (4,9%) com 10^1 UFC/g, 5 amostras (8,2%) com 10^3 UFC/g, 5 amostras (8,2%) com 10^4 UFC/g, 3 amostras (4,9%) com 10^5 UFC/g, 3 amostras (4,9%) com 10^6 UFC/g, 3 amostras (4,9%) com 10^7 UFC/g e uma amostra (1,7%) com 10^8 UFC/g (Tabelas 3 e 4; Gráfico 3).

Tabela 3 - Resultados do isolamento de *C. perfringens* e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos bovinos do grupo Controle

BOVINOS CONTROLE	ISOLAMENTO CP	QUANTIFICAÇÃO CP (UFC/g)
Amostras 1 à 73	negativo	< 10 UFC/g

Tabela 4 - Resultados do isolamento de *C. perfringens* e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos bovinos do grupo Estudo

BOVINOS ESTUDO (IDENT. AMOSTRAS)	ISOLAMENTO CP	QUANTIFICAÇÃO CP (UFC/g)
1	POSITIVO (CPA)	$1,7 \times 10^4$
2	POSITIVO (CPA)	$8,8 \times 10^4$
3	POSITIVO (CPA)	<10
4	POSITIVO (CPA)	$8,8 \times 10^7$
5	POSITIVO (CPA)	$1,0 \times 10^1$
6	POSITIVO (CPA)	$8,8 \times 10^5$
7	POSITIVO (CPA)	$5,0 \times 10^3$
8	POSITIVO (CPA)	$1,9 \times 10^5$
9	POSITIVO (CPA)	<10
10	POSITIVO (CPA)	$5,0 \times 10^3$
11	POSITIVO (CPA)	$2,1 \times 10^3$
12	POSITIVO (CPA)	$3,1 \times 10^5$
14	POSITIVO (CPA)	$5,0 \times 10^4$
15	POSITIVO (CPA)	$3,2 \times 10^8$
16	POSITIVO (CPA)	$1,0 \times 10^1$
29	POSITIVO (CPA)	$1,2 \times 10^6$
30	POSITIVO (CPA)	$5,9 \times 10^4$
31	POSITIVO (CPA)	$2,3 \times 10^7$
33	POSITIVO (CPA)	<10
36	POSITIVO (CPA)	<10
39	POSITIVO (CPA)	$1,2 \times 10^3$
43	POSITIVO (CPA)	$1,0 \times 10^6$
44	POSITIVO (CPA)	$4,2 \times 10^3$
45	POSITIVO (CPA)	<10
46	POSITIVO (CPA)	<10
47	POSITIVO (CPA)	1×10^4
49	POSITIVO (CPA)	$2,2 \times 10^7$
50	POSITIVO (CPA)	$1,2 \times 10^6$
52	POSITIVO (CPA)	$4,5 \times 10^1$
32 amostras	negativo	<10 UFC/g

Gráfico 3 - Resultados de proliferação celular de *C. perfringens* nos grupos dos bovinos

Os resultados mostram uma quantidade basal baixa em todos os bovinos controle (<10UFC/g) e uma variabilidade na quantificação de *C. perfringens* nos animais com alguma suspeita de enterotoxemia, com diferença estatisticamente significativa (Mann Whitney, $p=0,0001$). A mediana dos valores da proliferação celular no grupo controle de bovinos foi <10 UFC/g, e no grupo de estudo onde se isolou o microrganismo, foi 10^4 UFC/g com variação de <10 UFC/g até 10^8 UFC/g.

Comparando-se as metodologias de isolamento de *C. perfringens* ("Isolamento CP") e os resultados de proliferação celular do microrganismo nota-se que no grupo controle onde não se isolou a bactéria, todas resultaram em quantidades < 10 UFC/g. Já no grupo estudo, em todas as amostras em que não foi isolada a bactéria novamente as quantidades resultaram <10UFC/g, verificando uma variação de resultados de quantificação nas amostras em que foi isolado o microrganismo (<10 UFC/g até 10^8 UFC/g).

No grupo controle de ovinos ($n=24$), em 19 amostras (79,16%) de intestino delgado não foi isolado o *C. perfringens* e em todas essas foram observadas quantidades <10UFC/g do microrganismo. Já em 5 amostras (20,84%) isolou-se *C. perfringens* tipo A e 2 dessas amostras resultaram em quantidades <10 UFC/g, 2 amostras com 10^1 UFC/g e uma amostra com 10^2 UFC/g. No grupo estudo de ovinos ($n=12$), em oito amostras (66,66%) em que não se isolou o *C. perfringens* os valores de quantificação resultaram em <10 UFC/g de conteúdo, e em quatro amostras (33,34%) onde se isolou o microrganismo, duas amostras resultaram em 10^3 UFC/g, uma 10^5 UFC/g e uma 10^7 UFC/g (Tabelas 5 e 6; Gráfico 4).

Tabela 5 - Resultados do isolamento de *C. perfringens* e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos ovinos do grupo Controle

OVINOS CONTROLE (IDENT. AMOSTRAS)	ISOLAMENTO CP	QUANTIFICAÇÃO CP (UFC/g)
1	negativo	< 10 UFC/g
2	negativo	< 10 UFC/g
3	negativo	< 10 UFC/g
4	negativo	< 10 UFC/g
5	negativo	< 10 UFC/g
6	POSITIVO (CPA)	< 10 UFC/g
7	negativo	< 10 UFC/g
8	negativo	< 10 UFC/g
9	negativo	< 10 UFC/g
10	POSITIVO (CPA)	9X10 ¹ UFC/g
11	negativo	< 10 UFC/g
12	negativo	< 10 UFC/g
13	POSITIVO (CPA)	2x10 ¹ UFC/g
14	negativo	< 10 UFC/g
15	POSITIVO (CPA)	< 10 UFC/g
16	negativo	< 10 UFC/g
17	negativo	< 10 UFC/g
18	negativo	< 10 UFC/g
19	negativo	< 10 UFC/g
20	negativo	< 10 UFC/g
21	negativo	< 10 UFC/g
22	negativo	< 10 UFC/g
23	negativo	< 10 UFC/g
24	POSITIVO (CPA)	1,8x10 ² UFC/g

Tabela 6 - Resultados do isolamento de *C. perfringens* e quantificação (Quantificação CP) em intestino delgado dos ovinos do grupo Estudo

OVINOS ESTUDO (IDENT. AMOSTRAS)	ISOLAMENTO CP	QUANTIFICAÇÃO CP (UFC/g)
35	POSITIVO (CPA)	4,0 x 10 ³
51	POSITIVO (CPA)	2,97 x 10 ⁵
53	POSITIVO (CPA)	9,6 x 10 ⁷
54	POSITIVO (CPA)	1,1 x 10 ³
8 amostras	negativo	<10UFC/g

Gráfico 4 - Resultados de proliferação celular de *C. perfringens* nos grupos dos ovinos

Apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle de ovinos referente ao isolamento de *C. perfringens*, é notável a divisão de resultados da quantificação celular de *C. perfringens* entre os grupos. Igualmente como no caso dos bovinos, em todas as amostras com ausência de isolamento de *C. perfringens* as quantidades do microrganismo foram <10 UFC/g; e houve variação dos resultados da proliferação celular no grupo estudo de ovinos com diferença estatística não significativa ($p=0,25$). Nos ovinos, a mediana no grupo estudo foi de 10 UFC/g (10-180), mesmo valor obtido para o grupo controle (10 - $9,6 \times 10^7$).

Como esperado, essas observações confirmam a maior sensibilidade diagnóstica da metodologia de isolamento bacteriano uma vez que as amostras são enriquecidas em caldo Tarozi anteriormente ao plaqueamento em Agar sangue de carneiro 5% incubado em condições de anaerobiose.

Duas amostras controle de bovinos e cinco amostras estudo de bovinos revelaram presença de colônias enegrecidas no meio SPS na metodologia de quantificação da bactéria revelando a presença de *Clostridium* spp. sulfito redutores, porém não classificadas como *C. perfringens* pela PCR.

4.5 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA PARA DETECÇÃO DO GENE DA TOXINA ALFA (PLC)

4.5.1 Curva padrão

A concentração do plasmídeo clonado foi mensurada em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific®) resultando em 492 ng/μL.

A aplicação do cálculo para a quantificação do plasmídeo clonado resultou em 10^{11} cópias/μL.

A seguir os resultados de Cq referentes à curva padrão com o plasmídeo clonado utilizando-se o protocolo padronizado descrito na Seção Materiais e Métodos.

Tabela 7 - Valores de Cq obtidos na reação de PCR quantitativa em tempo real para detecção do gene da toxina alfa

CONCENTRAÇÃO DO GENE DA TOXINA ALFA	Cq (MÉDIA)
10^{10} cópias/5 μL	7,05
10^9 cópias/5 μL	10,48
10^8 cópias/5 μL	13,90
10^7 cópias/5 μL	17,43
10^6 cópias/5 μL	21,02
10^5 cópias/5 μL	25,10
10^4 cópias/5 μL	29,12
10^3 cópias/5 μL	32,20
10^2 cópias/5 μL	35,00
10^1 cópias/5 μL	0
10^0 cópias/5 μL	0

Erro: 0,0247

Eficiência: 1,873

Slope: -3,669

Para confirmação da especificidade da reação foi realizada análise da curva de *melting*, evidenciando uma T_m aproximada de 78°C e a especificidade dos produtos gerados sem a existência de dímeros de *primers* (*primer dimer*) como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Foto da análise da curva de *melting* das amostras da curva padrão da PCR em tempo real para detecção da toxina alfa mostrando pico de aproximadamente 78°C

Ainda, foi realizada a análise das amplificações em gel de agarose, que mostrou bandas específicas de aproximadamente 324 bp até a diluição 10^2 cópias/5 μ L (sensibilidade analítica).

4.5.2 PCR em tempo real para quantificação do RNAm da toxina alfa de *Clostridium perfringens* das amostras de campo e quantificação celular de *Clostridium perfringens*

Houve ausência de isolamento do *C. perfringens* em todas as amostras (n=73) de intestino delgado do grupo controle de bovinos, portanto não foi possível avaliar a expressão da toxina alfa neste grupo.

A metodologia aplicada às amostras para geração de cDNA foi com a utilização de *primers* randômicos pois, testando e comparando os métodos com *primers* randômicos ou *primer* específico (cpa-R), observou-se a presença de fortes bandas de dímeros de *primers* e uma menor frequência de presença de bandas específicas nas amostras geradas com o *primer* específico.

Foram utilizados 100 ng do RNA total dos isolados de *C. perfringens* cultivados por 18-24 horas em caldo BHI sob condições de anaerobiose para síntese de cDNA, eluídos em 40µL de água livre de nucelase. Para as reações de PCR em tempo real quantitativa utilizou-se 5 µL do cDNA para quantificação do RNAm da alfa toxina de *Clotridium perfringens*.

O resultado da PCR em tempo real com o cDNA das amostras mostrou uma variação de temperatura de *melting* de 78 a 81⁰C. Foi observada geração de poucos produtos inespecíficos, e em alguns casos observou-se a formação de *primer dimers*. Entretanto, nesse último caso a amostra foi considerada positiva se observado além do pico do dímero, outro dentro da faixa de temperaturas anteriormente descrita. Não foi observada reprodutibilidade da técnica, pois todos os valores mensuráveis gerados pela PCR em tempo real ficaram muito próximos ao limite inferior de detecção da técnica.

Desta forma, seguem os resultados gerais observados para as amostras onde foi positivo o isolamento de *C. perfringens* com os resultados da PCR convencional e das três repetições (há amostras em que foi possível realizar apenas duas repetições) da PCR em tempo real, expressos em número de cópias em 12,5 ng de RNA total (Quadro 5):

Quadro 5 - Resultados gerais das amostras/espécie, quantificação de *C. perfringens* (Quantificação CP), e resultados da PCR convencional e PCR em tempo real

Amostra (cDNA)	Origem amostras	Espécie animal	Grupo	Quantificação CP (UFC/g)	PCR convencional	PCR EM TEMPO REAL (repetição 1)	PCR EM TEMPO REAL (repetição 2)	PCR EM TEMPO REAL (repetição 3)
						Quantificação cópias gene	Quantificação cópias gene	Quantificação cópias gene
1	208/11 ID	bovina	caso	1,7x10 ⁴	Positivo	6,7 x 10 ²	4,2x10 ¹	1,1x10 ²
2	116/11 ID	bovina	caso	8,8 x 10 ⁴	Positivo	7,19 x 10 ¹	1x10 ¹	1,2x10 ²
3	156/11 ID	bovina	caso	<10	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
4	2747/10 ID	bovina	caso	8,8 x 10 ⁷	Positivo	7,19 x 10 ¹	Negativo	Negativo
5	318/11 ID	bovina	caso	1,0 x 10 ¹	Positivo	7,19 x 10 ¹	1X10 ¹	1X10 ²
6	2156/10 ID	bovina	caso	8,8 x 10 ⁵	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	1861/10 ID	bovina	caso	5,0 x 10 ³	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	2190/10 ID	bovina	caso	1,9 x 10 ⁵	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	2126/10 ID	bovina	caso	<10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	1902/10 ID	bovina	caso	5,0 x10 ³	Positivo	5,94 x 10 ¹	2X10 ³	NR
11	497/11 ID	bovina	caso	2,1 x 10 ³	Positivo	7,19 x 10 ¹	Negativo	6,7X10 ²
12	651/11 ID	bovina	caso	3,1 x 10 ⁵	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	1201/11 ID	bovina	caso	5,0 x 10 ⁴	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15	1338/11 ID	bovina	caso	3,2 x 10 ⁸	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
16	897/11 ID	bovina	caso	1,0 x 10 ¹	Positivo	7,19 x 10 ¹	Negativo	3,9X10 ²
29	1846/11 ID	bovina	caso	1,2 x 10 ⁶	Negativo	7,19 x 10 ¹	Negativo	1,2X10 ²
30	1892/11 ID	bovina	caso	5,9 x 10 ⁴	Negativo	7,19 x 10 ¹	Negativo	Negativo
31	1986/11 ID	bovina	caso	2,3 x 10 ⁷	Negativo	Negativo	Negativo	NR
33	1975/11 ID	bovina	caso	<10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	2011/11 ID	ovina	caso	4,0 x 10 ³	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	2073/11 ID	bovina	caso	<10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39	2456/11 ID	bovina	caso	1,2 x 10 ³	Positivo	7,19 x 10 ¹	Negativo	Negativo
43	2784//11 ID	bovina	caso	1,0 x 10 ⁶	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
44	2755/11 ID	bovina	caso	4,2 x 10 ³	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
45	1046/11 ID	bovina	caso	<10	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
46	081/12 ID	bovina	caso	<10	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
47	171/12 ID	bovina	caso	1 x 10 ⁴	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
49	121/12 ID	bovina	caso	2,2 x 10 ⁷	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50	250/12 ID	bovina	caso	1,2 x 10 ⁶	Positivo	7,19 x 10 ¹	Negativo	1,6X10 ¹
51	354/12 ID	ovina	caso	2,9 x 10 ⁵	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
52	580/12 ID	bovina	caso	4,5 x 10 ¹	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
53	664/12 ID	ovina	caso	9,6 x 10 ⁷	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
54	748/12 ID	ovina	caso	1,1 x 10 ³	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57	CP OV C13	ovina	controle	2,0 x 10 ¹	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
58	CP OV C10	ovina	controle	9,0 x 10 ¹	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
59	CP OV C15	ovina	controle	<10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60	CP OV C24	ovina	controle	1,8 x 10 ²	Positivo	Negativo	Negativo	2,8X10 ¹
65	CP OV C6	ovina	controle	<10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Todos os isolados de *C. perfringens* cultivados em meio BHI em anaerobiose por 18-24 horas tiveram seu RNA total extraído e submetido à transcrição reversa (cDNA) para detecção do RNAm da toxina alfa. Essa detecção foi avaliada pela metodologia de PCR convencional (resultado qualitativo) e PCR em tempo real (resultado quantitativo). Para classificação das amostras por PCR em tempo real, foi utilizada a curva de *melting* para confirmação da especificidade das reações (exclusão de bandas inespecíficas ou *primer dimers*) e eletroforese em gel de agarose 1%. Nos valores de quantificação da PCR em tempo real, mesmo algumas amostras estando abaixo do limiar de detecção da técnica anteriormente exposta (10^2 cópias/5 μ L), foram consideradas como positivas na tabela anterior após análise da curva de *melting* e da corrida em gel de eletroforese quando mostraram bandas específicas com sinal forte.

4.6 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE RNAm DA TOXINA ALFA DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

A PCR convencional para detecção do cDNA de RNAm da toxina alfa de *Clostridium perfringens* igualmente à PCR em tempo real obteve um limiar de detecção de 10^2 cópias/5 μ L (sensibilidade analítica). Os resultados referentes às amostras encontram-se no Quadro 5.

DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

A literatura associa geralmente a toxina alfa de *C. perfringens* com enterite fatal em bezerros e leitões, sugerindo que a doença seja uma consequência de vários fatores; afirma ainda que enquanto animais adultos parecem estar protegidos da doença como resultado de uma microbiota intestinal equilibrada formada e uma resposta imune protetora contra a toxina, os animais jovens não possuem proteção colostrar contra a toxina. Entretanto, alguns relatos descreveram a ocorrência do quadro em animais adultos (KALENDER; ERTAS; CETINKAYA, 2005; LOBATO et al., 2006). Em nosso estudo foram observados animais de todas as faixas etárias (<1,5 ano, entre 1,5 ano e 3 anos, > 3 anos) com quantificações elevadas de *C. perfringens*, e alguns deles com sintomas gastrintestinais e/ou nervosos precedentes, e, assim como Miyashiro, Nassar e Baldassi (2009), concluímos que pode haver uma maior predisposição de animais jovens à enterotoxemia, entretanto, a afecção pode também atingir animais adultos com a microbiota intestinal em equilíbrio.

A análise de distribuição das amostras em que foi isolado o *C. perfringens* mostrou a presença de picos que variaram nos anos do estudo. Isso porque a enterotoxemia é uma doença esporádica não contagiosa, mesmo se muitos casos fatais forem observados num mesmo rebanho (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). A doença está associada geralmente a condições estressantes observadas 24 a 36 horas antes da morte súbita. O *stress* pode se causado por uma mudança brusca na dieta (como por exemplo introdução de alto teor de carboidrato e substratos protéicos como grãos pesados, ou pastoreio em pastagem rica sem uma fase de adaptação gradativa, ou deficiência no fornecimento de água). Condições ambientais estressantes como reagrupamento de animais ou transporte, problemas hierárquicos ou manejo rude durante a descorna ou ordenha, antibioticoterapia e profilaxia anti-parasitária e alguns estados fisiológicos como parição, pico de lactação e estro também devem ser considerados como fatores predisponentes da enterotoxemia (LEBRUN; MAINIL; LINDEN, 2010).

A maioria das publicações nacionais relata casos isolados de enterotoxemia (LOBATO et al., 2006), porém dados de análises de isolados oriundos de um grupo

de animais nas mesmas condições geram dados epidemiológicos mais importantes para a caracterização e controle das clostridioses.

A tipagem molecular dos isolados de *C. perfringens* neste estudo mostrou uma frequência de 100% da presença de tipo A nos ruminantes estudados no período avaliado. Miyashiro, Nassar e Baldassi (2009) relataram uma frequência de 82,6% de cepas do tipo A em animais nas mesmas condições ao presente estudo, e Penha, Baldassi e Cortez (2005) encontraram uma frequência de 45,7% de cepas do tipo A, 51,4% do tipo C e 2,9% do tipo B, ambos os estudos referentes a casos de suspeita de enterotoxemia no País.

O tratamento na grande maioria dos casos de enterotoxemia é impraticável pela rapidez do óbito e, devido às características do agente, que é ubiqüitário do trato digestivo dos animais e solo e pela forma de resistência na natureza pela capacidade de esporulação, a erradicação da enfermidade é praticamente impossível. Seu controle e profilaxia baseiam-se em medidas adequadas de manejo evitando-se os fatores predisponentes, e principalmente em vacinações sistemáticas de todo o rebanho já que os animais estão em contato permanente com a bactéria. Para controle da enterotoxemia são aplicados toxóides (toxinas inativadas), sendo as vacinas comerciais disponíveis compostas por múltiplos antígenos. As vacinas contra as clostridioses devem ser administradas preferencialmente por via subcutânea, com duas doses intervaladas em 4-6 semanas e reforço após 12 meses e, quando o rebanho é sistematicamente vacinado os anticorpos colostrais protegem os bezerros por até 3-4 meses após o nascimento, devendo então a primovacinação ser realizada após esse período.

É sabido que o nível de atividade de PLC de *C. perfringens* produzida em meios de cultura difere bastante de cepa para cepa, porém não está claro se isso é devido à diferença na região codificante do *plc*, à diferença em outras regiões, ou ambas (TSUTSUI et al., 1995). Katayama et al. (1993) relataram diferenças na atividade transcricional do gene *plc* entre isolados de *C. perfringens* tipo A e tipo C, provavelmente devido a alguma diferença na regulação extragênica da expressão do gene. Da mesma maneira, Tsutsui et al. (1995) concluíram que a diferença na atividade de PLC entre diferentes cepas é devido à diferença no nível da produção da enzima, sugerindo que seja provavelmente devido à diferença no nível transcricional. Ainda, descreveram a variação da expressão do *plc* significativamente

maior entre cepas de *C. perfringens* tipo A do que nos outros tipos através de reação de *Northern blotting* semiquantitativo.

Há evidência emergente que sugere que os modelos de transcrição do RNAm são necessários mas não são por si só suficientes para a descrição quantitativa de sistemas biológicos. Essa evidência inclui descobertas de mecanismos pós transcricionais controlando a taxa de tradução das proteínas, a meia-vida de proteínas específicas ou RNAm, e ainda a localização intracelular e associação molecular dos produtos protéicos dos genes expressos. Gygi et al. (1999) exploraram a comparação quantitativa de transcritos de RNAm e níveis de expressão protéica para vários genes expressos no mesmo estado metabólico do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e a correlação do resultado foi insuficiente para prever os níveis de proteína a partir dos níveis de transcritos de RNAm, ao contrário de Whelan, Russel e Whelan (2003) que verificaram uma correlação entre os níveis de proteína e do RNAm utilizando uma combinação de PCR em tempo real e ensaio citométrico, o que nos leva a crer que essas associações são dependentes dos mecanismos regulatórios de cada gene. Infelizmente em nosso estudo não foi possível avaliar a presença ou quantificar a toxina alfa para verificação desta correlação. Existe um kit de ELISA comercial para detecção da toxina alfa, porém, além de haver variação nos níveis de sensibilidade e especificidade destes testes para detecção das toxinas de *C. perfringens*, sabe-se que a toxina alfa é rapidamente inativada no conteúdo intestinal após a morte do animal. Na maioria das vezes as amostras demoram a chegar ao laboratório por virem de todos os Estados do País, e, nesses casos, os resultados obtidos neste teste não teriam muito sucesso.

Neste estudo, para desenho da curva padrão da PCR quantitativa em tempo real, utilizou-se o fragmento do gene *plc* de *C. perfringens* clonado em plasmídeo pGEM-T-easy gerado com os *primers* utilizados para a reação molecular. Segundo Whelan, Russel e Whelan (2003) é bastante aplicada a clonagem do gene alvo inteiro ou pelo menos um fragmento de PCR maior do que o amplicon produzido pela PCR em tempo real. Porém, os autores comprovaram que essa medida não é necessária, podendo-se trabalhar com os mesmos *primers* utilizados para a PCR em tempo real na clonagem para desenho da curva padrão. Ainda, mostraram que os resultados são os mesmos para plasmídeos circulares ou linearizados, o que facilita

o estoque dos plasmídeos clonados de referência na forma circular pela sua maior estabilidade.

É aconselhável que sejam utilizadas quantidades aproximadas de RNA para comparação dos níveis de transcrição genética entre diferentes amostras. Existem algumas metodologias que produzem resultados muito diferentes para quantificação de ácido nucléico, portanto o mais importante é comparar todas as amostras com uma única metodologia para uniformizar o desvio do método (BUSTIN et al., 2009). No presente estudo utilizamos a mensuração e avaliação da qualidade do RNA pelo equipamento Nanodrop (ThermoScientific®) pela sua estabilidade.

O resultado da PCR em tempo real com o cDNA das amostras mostrou variações de temperatura de *melting* de 78 a 81⁰C, então quando resultou em picos únicos nas duplicatas dentro desta faixa as amostras foram consideradas positivas. A aplicação da reação em duplicata por amostra foi importante na determinação da especificidade e na confiabilidade do resultado através da avaliação da curva de *melting*. A leitura em gel de agarose 1% confirmou as interpretações resultantes da análise conjunta dos resultados de Cq com a curva de *melting*.

A PCR em tempo real quantitativa utilizando o sistema Sybr Green demonstrou boa repetibilidade gerando resultados praticamente idênticos entre as duplicatas da mesma amostra, porém em poucos casos observou-se a discrepância de resultados entre as mesmas devido à presença de dímeros de *primers* ou algum outro produto inespecífico, facilmente identificados pela análise da curva de *melting*. Segundo Bustin (2000) os valores de Cq gerados em diferentes corridas estão sujeitos à variação, entretanto, a variação inter-corrida não é apropriada.

Apesar da repetibilidade evidenciada, a PCR em tempo real não mostrou reprodutibilidade dos resultados, provavelmente pela quantidade de cópias de cDNA existente nas amostras estar bem próxima ao limiar de detecção da técnica, o que torna sua reprodução instável. Essas baixas quantificações podem ser devido à real baixa expressão do gene da toxina alfa em meio de cultura diferentemente do que aconteceria *in vivo*, ou devido à metodologia aplicada a partir de cultivo em 3 mL de caldo BHI por 18-24 horas ou ainda por deficiência na transcrição reversa. Hale e Stiles (1999) relataram a detecção da alfa toxina em filtrados de diferentes culturas de *C. perfringens* utilizando um ELISA indireto por captura partindo do sub-cultivo das bactérias em caldo BHI por 8 horas, demonstrando a variação das quantidades

produzidas da toxina alfa. Ainda, avaliando os genótipos, observaram que cepas do tipo A e tipo C produziram maior quantidade da toxina comparando-se com os tipos B ou D. Contudo, todas as cepas do tipo A utilizadas no estudo descrito por Hale e Stiles (1999) eram ligadas a casos de intoxicação alimentar em humanos e não promoveram a diversidade requerida para se avaliar a sensibilidade do teste para detecção da toxina alfa contra isolados de *C. perfringens* de outras origens.

Transcritos de RNA podem exibir estrutura secundária significativa que afeta a habilidade de DNA polimerases RNA-dependentes para gerar os transcritos (BUSTIN, 2000), então uma alternativa para um novo estudo seria a utilização de outra enzima na etapa de transcrição reversa que elimine problemas associados com estruturas secundárias de RNA, como por exemplo a AMV-RT (*avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*), além de testar um novo tempo da fase exponencial do cultivo e/ou um volume maior inicial para extração do RNA.

O cDNA aplicado no estudo foi obtido com *primers* randômicos e a enzima MMLV. Foram realizados testes de amplificação por PCR em tempo real em 10 amostras de cDNA sintetizados com *primers* randômicos e com o *primer* específico cpa-R-RT, e as análises das curvas de *melting* e média de Cq baseados no gel de eletroforese indicaram, além da presença de forte bandas de dímeros de *primers*, uma menor frequência de obtenção de bandas específicas nas amostras oriundas com o *primer* específico. A etapa de transcrição reversa pode ser realizada utilizando-se *primers* específicos ou *random primers*, e essa opção requer cuidado além da transcriptase reversa. O uso de *primers* específicos do RNAm diminui o *background* dos pareamentos, mas o uso de *primers* randômicos maximiza o número de moléculas de RNAm que podem ser analisadas a partir de uma pequena amostra de RNA. Assim como visualizado neste presente trabalho, a escolha dos *primers* pode causar uma variação marcante no número de cópias do RNAm calculado (BUSTIN, 2000).

Siqueira et al. (2012) objetivaram identificar e descrever polimorfismos no gene *plc* de 73 isolados obtidos de 51 diferentes fontes (amostras ambientais e de fezes de várias espécies animais, sadios e doentes), e identificaram substituições de 30 aminoácidos e 34 isoformas incluindo algumas com substituições em aminoácidos críticos à função da toxina. A maior parte (95%) dos isolados eram pertencentes ao tipo A e as relações filogenéticas entre as sequências de

aminoácidos identificadas neste estudo revelaram uma falta de correlação entre a fonte do respectivo isolado e o *status* sanitário dos animais. Sheedy et al. (2004) analisaram variações genéticas do gene da alfa toxina de *C. perfringens* isolados de aves e as diferenças encontradas eram resultado de substituições de uma única base e não alteravam significativamente as propriedades físicas da proteína codificada. A atividade da toxina de algumas cepas com sequências idênticas foi marcadamente diferente, indicando que os níveis variáveis da toxina devam ser devido a diferenças no crescimento da cepa ou expressão do que diferenças em atividade específica.

No presente estudo foram avaliadas duas metodologias para verificação da expressão do gene *plc*: PCR convencional para detecção do cDNA do RNAm e PCR em tempo real para quantificação do mesmo. As sensibilidades analíticas de ambas foram iguais (10^2 cópias/5 μ L), porém notou-se que mesmo nas amostras com valores de quantificação menores do que o limiar na PCR em tempo real foi visualizada banda forte e específica em corrida em gel de agarose 1%.

A PCR convencional, apesar de ser uma técnica qualitativa, mostrou melhor sensibilidade diagnóstica detectando maior número de positividade entre as amostras estudadas, quando comparada à PCR em tempo real.

A quantidade de RNAm da PLC não foi mensurada diretamente nas amostras de intestino de onde foi avaliada a quantificação celular do *C. perfringens*, e sim, após 18-24 horas de cultivo dos isolados em caldo BHI. Se admitirmos uma boa eficiência da etapa de transcrição reversa do RNAm do gene *plc*, esta observação nos leva a concluir que há uma diferença de níveis de transcrição do gene *plc* entre cepas pois, apesar de os dados quantitativos fornecidos pela PCR em tempo real não terem sido tão expressivos, há diferenças na classificação qualitativa pela PCR convencional entre as amostras.

Uma das principais ideias do projeto era comparar os níveis de transcrição do gene *plc* de *Clostridium perfringens* entre os grupos estudo e controle, porém a aplicação desta técnica depende do isolamento do microrganismo, o que não ocorreu em nenhuma das amostras do grupo controle de bovinos. Nos ovinos, apesar da baixa amostragem, não foi observada diferença estatisticamente significativa na transcrição do gene *plc*, mas sim na nítida separação de valores de quantificação entre os grupos.

Si et al. (2007) estudaram a correlação da proliferação celular de *C. perfringens* e expressão do gene da toxina alfa do microrganismo no desenvolvimento de enterite necrótica de aves, concluindo que a primeira mensuração pode ser utilizada para prever a incidência de lesões de enterite necrótica. Além disso, os autores concluíram que contagens maiores de 5 log₁₀ UFC/g no conteúdo intestinal são significativas para o desenvolvimento do quadro nas aves. Na reação de real-time PCR descrita o limiar de detecção foi de 100 cópias de moléculas de RNAm de *cpa* por reação, ou 10⁴ cópias/μg de RNA total. Neste estudo tanto a proliferação celular quanto a expressão de *cpa* demonstraram uma progressão na curva parabólica. Após o desafio dos animais em teste, o nível de expressão de *cpa* estava positivamente correlacionado com a proliferação celular de *Clostridium perfringens*, sendo que o desenvolvimento das lesões de enterite necrótica foi marginalmente explicado pelo nível de expressão de *cpa*, e a proliferação celular pôde ser usada para prever a incidência de lesões de enterite necrótica. Diferentemente do presente estudo, por ser uma mensuração em nível experimental, havia total controle dos animais e os intestinos das aves coletados foram imediatamente colocados em RNA later®, garantindo assim a conservação do RNA. Neste caso justifica-se a correlação dos resultados de proliferação celular e mensuração de RNAm da toxina alfa pois ambos foram avaliados diretamente das amostras de intestino delgado.

Em nosso estudo a quantificação de RNAm da alfa toxina não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (estudo e controle) considerando-se as amostras em que foi possível o isolamento do *Clostridium perfringens*, talvez pela baixa frequência de isolados obtidos nos animais controle. Ainda, a metodologia aplicada no presente estudo de se quantificar o RNAm da toxina em isolados de 24 horas em caldo BHI sob condições de anaerobiose pode não ter sido a melhor forma de se avaliar as diferenças de expressão do gene entre diferentes isolados, sendo necessária a aplicação de outros meios ou métodos para esta avaliação. Devido à instabilidade do RNA e levando-se em consideração as condições de envio e recebimento das amostras de intestino delgado com tempo relativamente variável entre o momento de morte do animal, colheita da amostra, chegada ao Instituto Biológico e processamento das amostras, julgou-se não adequada a quantificação de RNAm da toxina diretamente das amostras intestinais.

Apesar de bem conhecida e relatada a presença do *Clostridium perfringens* na microbiota intestinal dos animais em equilíbrio (grupo controle), notou-se uma baixa quantificação celular do organismo neste ambiente, além da alta frequência (100%) de não isolamento do microrganismo mesmo com enriquecimento em meio Tarozzi previamente ao plaqueamento em Agar sangue de carneiro a 5% nos animais do grupo controle, concluindo que provavelmente em animais sadios a quantidade basal seja tão baixa que impede o isolamento do bacilo.

Manteca et al. (2001) estudaram uma população de bezerros *Belgian Blue* com 2 a 4 meses de idade no sudoeste da Bélgica, frequentemente acometidos por quadros de enterotoxemia bovina com alta taxa de fatalidade, mortes súbitas, lesões de enterite hemorrágica do intestino delgado e, geralmente, ausência de outros sinais. Estudaram duas populações, uma denominada “estudo” composta de intestino delgado de bezerros que morreram subitamente ou muito rapidamente com lesões necrohemorrágicas intestinais e outro grupo denominado “controle” de bezerros que morreram por outra causa. *C. perfringens* foi isolado em maiores números e de mais animais na população estudo do que na população controle, embora resultados individuais de ambas as populações tenham se sobreposto. A contagem bacteriana na população controle dos bezerros *Belgian Blue* foi bem maior do que outros dados da literatura em outras raças: 10^4 versus $10^{2,5}$ UFC/mL de conteúdo intestinal (DAUBE, 1992²apud MANTECA et al., 2001) mostrando, talvez, uma maior susceptibilidade da raça *Belgian Blue* à enterotoxemia e, como no presente trabalho, todos os isolados deste estudo foram identificados como tipo A.

Outros estudos em ruminantes que compararam a proliferação celular de *C. perfringens* apresentaram resultados variáveis (POPOFF, 1989; MANTECA et al., 2001). Em nosso estudo, paralelamente à quantificação do microrganismo, aplicamos uma metodologia para isolamento do mesmo com uma etapa de enriquecimento em meio Tarozzi anteriormente ao plaqueamento, o que a torna bastante sensível. No grupo controle dos bovinos, além de 100% das amostras terem resultado em quantidades menores de 10 UFC/g de conteúdo intestinal, não isolamos a bactéria em nenhuma delas. A diferença entre os estudos anteriores e o presente é que o grupo controle era composto de animais que morreram por outra

---

² DAUBE, G. *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. **Ann. Méd. Vét.** 136, 5-30, 1992.

causa, ou seja, havia alguma patologia envolvida, e neste colhemos amostras de conteúdo intestinal de animais hígidos levados ao abate. Levando-se em consideração: a possibilidade de equívocos na observação em campo da “morte súbita” dos animais que compuseram o grupo estudo; o fato de termos isolado o microrganismo em 47,54% dos animais suspeitos deste grupo e que no grupo controle composto por animais hígidos a bactéria não foi isolada, podemos traçar as conclusões de que 52,46% dos animais do grupo estudo morreram por alguma outra causa não identificada e que as mudanças nos níveis populacionais de *C. perfringens* no intestino não são uma consequência de qualquer processo patológico.

Ainda, apesar do baixo número de animais controle analisados, verificou-se uma maior frequência de sucesso no isolamento do *C. perfringens* e quantificação celular em ovinos (frequência de 20,83%, e todos com quantificações $<10^2$ UFC/g de conteúdo) do que nos bovinos (0%), inferindo talvez a maior predisposição dos pequenos ruminantes ao processo de enterotoxemia. Além de fatores que alteram o ambiente intestinal como overdose de grãos, infestação parasitária, stress térmico e concomitante infestação por coccídios, há relatos em caprinos criados sob sistemas extensivos sem mudança brusca de alimentação envolvida. O histórico de mudança brusca na dieta é um indicativo útil para a suspeita da enterotoxemia, mas a ausência deste precedente não deve ser utilizada para excluir a possibilidade do processo da doença. O histórico de vacinação é frequentemente utilizado pelos proprietários e veterinários de campo para excluir o envolvimento de *C. perfringens*. Entretanto, a qualidade das vacinas varia muito entre países e produtores, e as vacinas não são sempre bem transportadas, armazenadas e administradas dentro das condições ideais. Além disso, a variação individual na resposta de anticorpos entre animais ocorre frequentemente em ovinos e caprinos (UZAL, 2004).

O papel da alfa toxina foi comprovado *in vivo* em quadros de enterite necrótica em aves (SI et al., 2007) e a identificação de isolados de *C. perfringens* β 2-toxigênicos em várias espécies animais com quadros de enterite necrótica e/ou hemorrágica e enterotoxemia têm reacendido a discussão sobre a importância desta toxina na patogenicidade do microrganismo (GIBERT; JOLIVET-RENAUD; POPOFF, 1997; KLAASEN et al., 1999).

Bueschel et al. (2003) triaram 3270 isolados de *C. perfringens* de várias espécies animais e observaram que 37,2% dos mesmos continham o gene *cpb2*. Encontraram maior porcentagem de cepas *cpb2* positivas em bovinos com enterite (21,4%) e bezerros com enterite ou abomasite (21,4%) comparando-se com uma população de isolados provenientes de bovinos com outras doenças (12,8%). Entretanto, essas diferenças nas frequências foram bem menos expressivas do que entre leitões ou porcos adultos. Neste mesmo estudo a presença de *cpb2* em isolados de *C. perfringens* de outras espécies variou 12% em caprinos e 20% em ovinos. Isolados ambientais, como de alimento animal, alimento humano e solo, mostraram uma baixa ocorrência de *cpb2*.

Manteca et al. (2002) estudaram por hibridização da colônia a presença do gene *cpb2* em isolados de *C. perfringens* de bovinos e, das 714 cepas da população de estudo, 218 (31%) foram positivas e, na população controle, 113 (29%) foram positivas com a sonda da $\beta 2$. Entretanto, os mesmos autores relataram outro experimento no qual diferentes extratos foram inoculados em alças ligadas de um bezerro cujo resultado trouxe nova evidência para a importância da toxina $\beta 2$ pois houve desenvolvimento de lesões necróticas e hemorrágicas em duas de três alças inoculadas com uma cepa de *C. perfringens*- $\beta 2$ positiva em sinergia com a toxina α .

No nosso grupo estudo 54,55% dos isolados de *C. perfringens* continham o gene *cpb2*, corroborando com outros estudos de que este gene está amplamente distribuído entre os bovinos e ovinos.

A presença do gene da toxina $\beta 2$ em animais saudáveis não são um risco por si só, porém pode ser um fator a mais contribuindo com a patogenicidade da bactéria no caso de haver um distúrbio no equilíbrio fisiológico do intestino e microbiota residente devido a alguma mudança brusca na alimentação, antibioticoterapia ou suplementação sem adaptação (GURJAR et al., 2008).

Em pequenos ruminantes os dados sobre a presença de *cpb2* são muito escassos. Em cordeiros com disenteria, Gkiourtzidis et al. (2001) detectaram cepas positivas para *cpb2* porém em baixa frequência (7/117). No presente estudo, do total de 9 isolados de *C. perfringens* em ovinos, oito (88,9%) foram positivos para o gene *cpb2*, demonstrando também sua alta distribuição nessa espécie animal. Porém, devido à escassez de dados disponíveis e informação sobre a produção da toxina,

nenhuma conclusão pode ser traçada sobre o papel da toxina β_2 nas doenças entéricas de pequenos ruminantes.

A falta de estudos disponíveis na área de bacteriologia de anaeróbios importantes na área veterinária dificulta a base para delineamento experimental, comparação e discussão dos resultados apresentados. Apesar disso, os nossos resultados são pioneiros e servirão como um apoio a novos estudos microbiológicos básicos e moleculares para o avanço científico nesta área em nosso País. O veterinário de campo deve estar atento ao histórico (morte súbita, *stress*) e ao aspecto da lesão no exame *postmortem* como jejunoileite hemorrágica. Idealmente, essa suspeita deve ser confirmada pela cultura bacteriológica anaeróbica e quantificação de *C. perfringens* em amostras em boas condições, o que muitas vezes é difícil devido à distância do local onde ocorreu o episódio e o laboratório. Após a identificação bacteriana, a sua tipagem deve ser determinada. Os critérios para definição da enterotoxemia não estão claramente definidos e determinados, pois há muita variação nas metodologias de quantificação do microrganismo, por exemplo. Ainda, há muitos relatos antigos cuja tipificação de *C. perfringens* era realizada por soroneutralização em camundongos, e hoje, com a evolução nas técnicas empregadas, algumas cepas originalmente classificadas em um toxinotipo têm sido revisadas e classificadas em outro toxinotipo aplicando-se as técnicas moleculares atuais, sendo difícil interpretar esses relatos antigos.

No campo, a enterotoxemia por *C. perfringens* tem ocasionado implicações de custo e bem-estar animal aos criadores, que perdem animais de alto valor pela enfermidade. Enquanto novos estudos são necessários para fornecer melhores dados para o entendimento da patogenicidade de *C. perfringens*, um bom controle baseado na vacinação sistemática do rebanho e alimentação controlada continua sendo o melhor meio de prevenção da enterotoxemia.

CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

- a) *Clostridium perfringens* foi isolado em 47,54% do grupo estudo de bovinos e em nenhuma amostra do grupo controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de bovinos.
- b) Em ovinos, no grupo estudo foi isolado em 33,33% amostras e em 20,83% do grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de ovinos.
- c) O tipo A foi o único tipo de *C. perfringens* isolado dentro das condições do estudo.
- d) O gene da toxina $\beta 2$ foi detectado em 54,54% dos isolados de *C. perfringens*, porém não foi possível avaliar seu papel como fator de risco para enterotoxemia.
- e) Todas as amostras de intestino delgado do grupo controle de bovinos resultaram em quantidades <10 UFC/g e ausência de isolamento do microrganismo. No grupo estudo a mediana dos valores da proliferação celular foi 10^4 UFC/g com variações de <10 UFC/g até 10^8 UFC/g.
- f) Bovinos hígidos apresentam em sua microbiota intestinal uma quantidade bastante baixa de *C. perfringens* (<10 UFC/g de conteúdo). Apesar da pequena amostragem de ovinos avaliada, observou-se uma quantidade de até 10^2 UFC/g nos animais hígidos talvez devido à maior susceptibilidade da espécie para as coccidioses que predispõem os quadros de enterotoxemia. Devido à dificuldade na observação e obtenção de dados fidedignos dos quadros de “morte súbita” para correta classificação das suspeitas de enterotoxemias, avalia-se que ainda seja inconclusivo um ponto de corte da quantidade de *Clostridium perfringens* que defina o quadro.
- g) A PCR em tempo real quantitativa mostrou boa repetibilidade porém má reprodutibilidade devido aos níveis de transcritos da toxina alfa de *C. perfringens* estarem próximos ao limiar de detecção da técnica. A PCR convencional mostrou que há diferenças de transcrição do gene entre cepas, e os resultados corroboram com a existência de algum fator *in vivo*

desencadeador do sistema VirR/VirS que modula a transcrição deste fator de virulência.

- h) O isolamento de *C. perfringens* pode servir como triagem na detecção do microrganismo e, uma vez sendo positivo, deve-se proceder a metodologia de quantificação.
- i) Um levantamento de dados epidemiológicos mais detalhados do período *antemortem* aliado à sequência de metodologias expostas no tópico anterior podem, num estudo mais prolongado, auxiliar na definição dos fatores de risco para as enterotoxemias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBINI, S.; BRODARD, I.; JAUSSE, A.; WOLLSCHLAEGER, N.; FREY, J.; MISEREZ, R.; ABRIL, C. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 179-85, 2008.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMIGHT, J.A.; STRUHL, K. (EDS.). **Current Protocols in Molecular Biology**. 3rd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1998.

BA-THEIN, W.; LYRISTIS, M.; OHTANI, K.; NISBET, I.T.; HAYASHI, H.; ROOD, J.I.; SHIMIZU, T. The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 9, p. 2514-20, 1996.

BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 11-6, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n. 62 de 20/08/2003. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 20 ago. 2003. Anexo I, p.8-11.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 195-202, 2002.

BUESCHEL, D. M.; HELEN JOST, B.; BILLINGTON, S.J.; TRINTH, H.T.; GLENN SONGER, J. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 121-129, 2003.

BULLIFENT, H.; MOIR, A.; AWAD, M.M.; SCOTT, P.T.; ROOD, J.I.; TITBALL, R.W. The Level of Expression of $\hat{I}$ -toxin by Different Strains of *Clostridium perfringens* is Dependent on Differences in Promoter Structure and Genetic Background. **Anaerobe**, v. 2, p. 365-371, 1996.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-93, 2000.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CANARD, B.; COLE, S. T. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 17, p. 6676-80, 1989.

CARTER, G.R.; WISE, D. J. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 248

COLLIE, R. E.; MCCLANE, B. A. Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 30-6, 1998.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods** (San Diego, Calif.), v. 50, n. 4, p. 227-30, 2010.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T. M.; KENNETH, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunological Methods**, v. 354, n. 1-2, p. 34-9, 2010.

DRAY, T. *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 251-253, 2004.

FERRAREZI, M. C.; CARDOSO, T. C.; DUTRA, I. S. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. **Anaerobe**, v. 14, n. 6, p. 328, 2008.

FILHO, E. J. F.; CARVALHO, A.U.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.F.; RACHID, M.A.; CARVALHO, A.A.; FERREIRA, P.M.; NASCIMENTO, R.A.; FERNANDES, A.A.; VIDAL, J.E.; UZAL, F.A. Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1213-20, 2009.

GARMORY, H. S.; CHANTER, N.; FRENCH, N.P.; BUESCHEL, D.; SONGER, J.G.; TITBALL, R.W. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. **Epidemiology and Infection**, v. 124, n. 1, p. 61-7, 2000.

GIBERT, M.; JOLIVET-RENAUD, C.; POPOFF, M. R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by CP.pdf. **Gene**, v. 203, p. 65-73, 1997.

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

GURJAR, A A.; HEGDE, N.V.; LOVE, B.C.; JAYARAO, B.M. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 2, p. 90-5, 2008.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; ROBERT FRANZA, B.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast correlation between protein and mRNA abundance in yeast, **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, 1999.

HALE, M. L.; STILES, B. G. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin using a capture antibody ELISA. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 471-84, 1999.

HANNA, P. C.; WIECKOWSKI, E.U.; MIETZNER, T.A.; MCCLANE, B.A. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 5, p. 2110-2114, 1992.

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

KALENDER, H.; ERTAS, H.; CETINKAYA, B. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. **Veterinary Medicine - Czech**, v. 10, p. 439-442, 2005.

KATAYAMA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; MIZOBUCHI, S.; OKABE, A. Comparison of the alpha-toxin genes of *Clostridium perfringens* type A and C strains: evidence for extragenic regulation of transcription. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 2, p. 457-63, 1993.

KENNEDY, C. L.; LYRAS, D.; CHEUNG, J.K.; HISCOX, T.J.; EMMINS, J.J.; ROOD, J.I. Cross-complementation of *Clostridium perfringens* PLC and *Clostridium septicum* alpha-toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 3, p. 413-8, 2009.

KLAASEN, H. L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; BAKKER, J.; MISEREZ, R.; HÄNI, H.; FREY, J.; POPOFF, M.R.; VAN DEN BOSCH, J.F. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 325-32, 1999.

KNARREBORG, A.; SIMON, M.A.; ENGBERG, R.M.; JENSEN, B.B.; TANNOCK, G.W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5918-24, 2002.

KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W.; HUNTER, P. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia. **Infectious Diseases of Livestock With Special Reference to Southern Africa**, p. 1315-1322, 1994.

LEBRUN, M.; MAINIL, J. G.; LINDEN, A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. **The Veterinary Record**, v. 167, n. 1, p. 13-22, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods** (San Diego, California), v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; ABREU, M.F. SOUZA JR.; LIMA, C.G.R.D.; SALVARANI, F.M. Enterotoxemia em bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 952-954, 2006.

LOBATO, F. C. F.; SILVA, N. DA; ALMEIDA, A. C. Clostridiose dos ruminantes. **A Hora Veterinária**, v. 101, p. 35-40, 1998.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MANTECA, C.; DAUBE, G.; PIRSON, V.; LIMBOURG, B.; KAECKENBEECK, A.; MAINIL, J.G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 21-32, 2001.

MANTECA, C.; DAUBE, G.; JAUNIAUX, T.; LINDEN, A.; PIRSON, V.; DETILLEUX, J.; GINTER, A.; COPPE, P.; KAECKENBEECK, A.; MAINIL, J.G. A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 191-202, 2002.

MARY JO ZIMBRO, B.S.; POWER, D. A. (ed.). **Difco & BBL Manual**. Maryland: Becton, Dickson and Company, 2003. p. 696

MCCLANE, B.A. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Toxicon**, v. 34, p. 1335-1343, 1996.

MEER, R. R.; SONGER, J. G. Multiplex PCR method for genotyping *Clostridium perfringens*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 58, p. 702-705, 1997.

MICLARD, J.; JÄGGI, M.; SUTTER, E.; WYDER, M.; GRABSCHEID, B.; POSTHAUS, H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 320-5, 2009.

MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; BALDASSI, L. Genotyping of *Clostridium perfringens* associated with sudden death in cattle. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 491-497, 2009.

MÖLLBY, R. Bacterial phospholipases. In: JELJASZEWICZ, J.; WADSTRÖM, T. (ed.). **Bacterial toxins and cell membranes**. London: Academic Press Inc., 1978. p. 367-424.

MORRIS, W. E.; DUNLEAVY, M.V.; DIODATI, J.; BERRA, G.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E. Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 143-7, 2012.

NIILO, L.; AVERY, R. J. Bovine enterotoxemia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 64, n. 2, p. 31-36, 1963.

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

NIILO, L. Diagnostic problems of diseases caused by *Clostridium perfringens*. **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis**, n. 22, p.33–52, 1979.

OHTANI, K.; HIRAKAWA, H.; TASHIRO, K.; YOSHIZAWA, S.; KUHARA, S.; SHIMIZU, T. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 258-64, 2010.

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

PIERSON, R. E.; JENSEN, R.; LAYERMAN, L.H.; SAARI, D.A.; BRADDY, P.M.; MCCHESENEY, A.E.; HORTON, D.P. Sudden deaths in yearling feedlot cattle. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 169, n. 5, p. 527-529, 1976.

POPOFF, M. R. Les entérotoxémies. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 140, n. 6, p. 479-491, 1989.

POPOFF, M. R.; STILES, B. G. Clostridial toxins vs. other bacterial toxins. In: Dürr, P. (ed.). **Handbook on clostridia**. Boca Raton, FL: p. 323-385, 2005.

ROOD, J. I.; COLE, S. T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 621-48, 1991.

SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L. Some properties of beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. **Infection and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 678-80, 1978.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 13, p. 1103-12, 1999.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B.A.; MILLS, A.G.; GORN, V.; SINGER, M.J.; REED, M.W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194-204, 2000.

SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; HELEN JOST, B.; GLENN SONGER, J.; TWETEN, R.K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5546-51, 2000.

SHEEDY, S.; INGHAM, A.B.; ROOD, J.I.; MOORE, R.J. Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of *Clostridium perfringens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1345-1347, 2004.

SHIMIZU, T.; YAGUCHI, H.; OHTANI, K.; SAYERA, B.; HAYASHI, H. Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 257-65, 2002.

SI, W.; GONG, J.; HAN, Y.; YU, H.; BRENNAN, J.; ZHOU, H.; CHEN, S. Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 7110-3, 2007.

SIQUEIRA, F. F.; ALMEIDA, M.O.; BARROCA, T.M.; HORTA, C.C.R.; CARMO, A.O.; SILVA, R.O.S.; PIRES, P.S.; LOBATO, F.C.F.; KALAPOTHAKIS, E. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (plc) reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 397-405, 2012.

SOLER-JOVER, A.; BLASI, J.; ARANDA, I.G.; NAVARRO, P.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R.; MARTÍN-SATUÉ, M. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 7, p. 931-42, 2004.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 156-61, 1997.

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

STILES, B. G.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. **Infection and Immunity**, v. 54, n. 3, p. 683-8, 1986.

STUTZ, M. W.; LAWTON, G. C. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 63, n. 10, p. 2036-42, 1984.

TITBALL, R. W. **Bacterial phospholipases**. Symposium series (Society for Applied Microbiology), v. 27, p. 127S-137S, 1998.

TITBALL, R. W.; HUNTER, S.E..C.; MARTIN, K.L.; MORRIS, B.C.; SHUTTLEWORTH, A.D.; RUBIDGE, T.; ANDERNO, 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. 367-76, 1989.

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Anaerobe**, v. 5, n. 2, p. 51-64, 1999.

TSUTSUI, K.; MINAMI, J.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S.I.; 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. 7164-70, 1995.

UZAL, F. A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **Anaerobe**, v. 10, n. 2, p. 135-43, 2004.

UZAL, F. A.; SONGER, J. G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 253-65, 2008.

VANCE, H. N. A survey of the alimentary tract of cattle for *Clostridium perfringens*. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, n. 10, p. 260-4, 1967.

WEN, Q.; MCCLANE, B. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2685-2691, 2004.

WHELAN, J. A; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 278, n. 1-2, p. 261-269, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A- PROTOCOLO PARA PREPARO DO MEIO TAROZZI

- a. Preparar 1 L de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e reservar em um erlenmeyer de 2L;
- b. Picar 400 g de fígado bovino em pedaços do tamanho de avelãs utilizando uma faca afiada e uma tábua para cortar;
- c. Acrescentar os pedaços de fígado ao caldo, cobrir a boca do erlenmeyer com papel alumínio;
- d. Levar o erlenmeyer à autoclave com a água fervendo, fechar as válvulas da tampa e manter a válvula da pressão aberta para obtenção de vapor fluente por 30 minutos;
- e. Fixar um pedaço de gaze coberto de algodão preso com auxílio de um barbante a um becker de 2 L, e filtrar o caldo;
- f. Lavar os fragmentos de fígado em água corrente para desembaraçá-los de material pulverulento, que turva o caldo;
- g. Adicionar a cada tubo 2-3 pedaços de fígado;
- h. Adicionar 10 mL do caldo filtrado;
- i. Adicionar 1,5-2 mL de vaselina sólida fundida;
- j. Esterilizar os tubos a 121°C por 30 minutos.

APÊNDICE B - PROTOCOLO PARA PREPARO DE MEIO SPS (COM 0,2% DE AZIDA SÓDICA)

OBS: preparo de 5 frascos com 175 mL de meio. Cada frasco é suficiente para o plaqueamento por *pour plate* de todas as diluições (10^{-1} a 10^{-7}) de uma amostra.

- a. Pesar 35 g de SPS Agar- Himedia;
- b. Pesar 0,175 g de azida sódica;
- c. Mensurar 875 mL de água destilada em proveta;
- d. Dissolver o pó do meio na água destilada em frasco reagente ou balão volumétrico;
- e. Aquecer o frasco com a solução em micro-ondas interrompendo o aquecimento cada vez que for notado o início de fervura e agitando delicadamente o frasco até o pó dissolver completamente porém evitando o aquecimento excessivo;
- f. Aliquotar aproximadamente 175 mL por frasco reagente de 250 mL utilizando a marcação volumétrica do frasco;
- g. Autoclavar os frascos a 121°C por 15 minutos;
- h. Após resfriar, cobrir os frascos com papel alumínio para proteger o meio da luz e mantê-los sob refrigeração até o uso;

APÊNDICE C- PROTOCOLO PARA PREPARO DE AGAR SANGUE DE CARNEIRO 5% (COM 0,2% DE AZIDA SÓDICA)

- a. Pesar 9,5 g de Himedia-Mueller Hinton Agar;
- b. Mensurar 250 mL de água destilada em proveta;
- c. Dissolver o pó do meio na água destilada em frasco reagente ou balão volumétrico;
- d. Aquecer o frasco com a solução em micro-ondas interrompendo o aquecimento cada vez que for notado o início de fervura e agitando delicadamente o frasco até o pó dissolver completamente porém evitando o aquecimento excessivo;
- e. Pesar 0,05 g de azida sódica e adicionar ao Mueller Hinton dissolvido;
- f. Identificar o frasco com o nome do meio;
- g. Autoclavar o frasco a 121°C por 15 minutos;
- h. Após resfriar o meio a uma temperatura suportável ao toque, adicionar 12,5 mL de sangue de carneiro desfibrinado estéril e homogeneizar gentilmente;
- i. Aliquotar aproximadamente 15 ml do meio em placas de petri estéreis;
- j. Deixar as placas em repouso em superfície limpa e plana até a solidificação do agar;
- k. Manter as placas invertidas sob refrigeração até o uso.