THAÍS S. P. FERREIRA

Caracterização genotípica de amostras
de *Clostridium perfringens* provenientes
de suínos através da eletroforese em gel
de campo pulsado (PFGE)

São Paulo
2006

THAÍS S. P. FERREIRA

**Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium*
perfringens provenientes de suínos através da
eletroforese em gel de campo pulsado
(PFGE)**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2006

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.1822
FMVZ

Perreira, Thaís S. P.

Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) / Thaís S. P. Perreira. — São Paulo : T. S. P. Perreira, 2006.
66 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Micke Moreno.

1. *Clostridium*. 2. Suínos. 3. Diarréia. 4. Reação em cadeia por polimerase. 5. PFGE. I. Título.

FERREIRA, T. S. P. **Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).** [Genotypic characterization of *Clostridium perfringens* deriving from swine by pulsed-field (PFGE)]. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

ERRATA

Folha: 39

Parágrafo: 2

Linha: 7

Onde se lê: lise *in situ*

Leia-se: lise *in situ* através da enzima de restrição Sma I

Folha: 44

Parágrafo: 3

Linha: 2

Quadro: Título

Onde se lê: Número de amostras isoladas relacionadas com o número de amostras analisadas e o número de perfis correspondente.

Leia-se: Número de amostras isoladas relacionadas com o número de amostras analisadas.

Linha: 2 Colina: 2

Onde se lê: 22

Leia-se: 26

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* de origem suína através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)", protocolo nº672/2005, utilizando 100 peças de abatedouro de suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Genotypic characterization of *Clostridium perfringens* from swine origin by pulsed field electrophoresis (PFGE)", protocol number 672/2005, utilizing 100 parts from slaughterhouse (swine), under the responsibility of Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de outubro de 2005

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Thaís S. P.

Título: Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por todo amor e dedicação;
A Deus por ter me permitido continuar aprendendo.

A Andrea Micke Moreno minha orientadora, por todo apoio e auxílio na elaboração deste trabalho, além da importante amizade que se estabeleceu durante este período de convivência.

As amigas do laboratório Renata Paixão, Renata R. de Almeida, Cleise R. Gomes, Karina S. Castila, Débora D. S. Gobbi, Luciane T. S. Zucon, Tânia, Daniele C. Ares, Márcia.... e Marina Moreno por toda ajuda e grande amizade.

Aos amigos Rafael Bueno, Franco F. Calderaro e Roberto Bordin pela convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. José Antonio Piatino Ferreira e a todos amigos do laboratório de Ornitopatologia pela colaboração com este trabalho.

Ao meu querido Renato Alonso Mian pelo incentivo, amor e companherismo.

Aos meus pais Antonio L. Ferreira e Edneia Vânia P. Ferreira por todo amor, educação, dedicação e incentivo em todos os momentos.

Aos meus irmãos Julia e Francisco por todo amor, carinho e incentivo.

A todos os meus familiares pela dedicação.

A todos os estagiários que passaram pelo laboratório nesse período.

A Dona Odete por toda ajuda.

A FAPESP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado
(proc.04/04024-2)

A Deus pela vida.

RESUMO

FERREIRA, T. S. P. **Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).** [Genotypic characterization of *Clostridium perfringens* deriving from swine by pulsed-field (PFGE)]. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Clostridium perfringens é um importante patógeno envolvido em doenças entéricas dos animais domésticos e quadros de toxinfecção alimentar em humanos. Embora as infecções causadas por *C. perfringens* biotipo C e A em suínos sejam amplamente estudadas, existem poucos relatos que descrevem as reais correlações genéticas existentes na cadeia epidemiologia das clostridioses para esta espécie animal, assim como a transmissão do agente através da fêmea lactante, e a eliminação e perpetuação do agente no momento do abate. O presente estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização genotípica através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *C. perfringens* isoladas a partir de fezes e de carcaças de suínos no momento do abate, fezes de fêmeas suínas e seus leitões e de amostras de farinha de carne e ossos. Foi ainda realizada a comparação dessas cepas com cepas isoladas a partir de leitões com enterite. A frequência de isolamento do agente em carcaças, em fezes de leitões terminados e a partir de farinha de carne e osso foram, 44,2%, 52,5%, e 32,2% respectivamente. De acordo com a reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram detectadas somente as toxinas alfa e beta 2, sendo esta

ultima detectada somente nos casos de enterite. Por meio da PFGE as amostras foram caracterizadas em 97 perfis genéticos com um alto índice discriminatório. As amostras isoladas de carcaça apresentaram alta similaridade em relação às de origem fecal, os isolados de farinha de carne apresentaram perfis similares aos obtidos em isolados de fezes de fêmeas, leitões sadios e leitões com enterite. E os isolados de leitões com e sem enterite apresentaram baixa similaridade em relação aos isolados de fêmeas.

Palavras-chave: *Clostridium*. Suínos. Diarréia. Reação em cadeia pela polimerase. Eletroforese em gel de campo pulsado.

ABSTRACT

FERREIRA, T. S. P. **Genotypic characterization of *Clostridium perfringens* from swine by pulsed field gel electrophoresis (PFGE)**. [Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)]. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Clostridium perfringens is an important enteric disease pathogen of domestic animals and foodborne diseases of human beings. Although infections caused by *C. perfringens* type C and A in swine are well studied, just few reports describe genetic relationship among strains in the epidemiological chain of Swine Clostridiosis, as well as the transmission of the microorganism by the nursing female its elimination and maintenance at slaughterhouses. The aim of the present study was the isolation and genotypic characterization by Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE), of *C. perfringens* strains from feces and carcasses from at slaughterhouse pigs, feces from sows and their piglets, and samples of meat and bone meal. The microorganism isolation frequencies in carcasses, finishing pig feces, and meat and bone meal were 44.2%, 52.5%, 32.2%, respectively. According to Polymerase Chain Reaction (PCR) assay, only the alfa and beta 2 toxins were detected; whereas beta 2 toxin was detected barely in cases of enteritis. By means of the PFGE assay technique the samples were characterized in 97 genetic profiles with a high discriminatory level. Strains from carcasses

samples presented high similarity to strains from fecal origin. strains from meat and bone meal samples showed similar profiles to strains from sow feces samples; of sows, asymptomatic piglets and piglets with enteritis. And strains isolated from piglets (asymptomatic and with enteritis) presented low similarity to strains from sow feces samples.

Key Words: *Clostridium*. Swine. Diarrhea. Polymerase chain reaction. Pulsed field gel electrophoresis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras de suabes e fezes, coletados em quatro abatedouros de São Paulo e freqüência de amostras positivas para <i>C. perfringens</i>	42
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Percentagem de suabes de carcaça e amostras de fezes positivas para isolamento de *C. perfringens*.....43
- Figura 2- Eletroforese em campo pulsado- PFGE. Colunas 2 a 14 cepas de *C. perfringens* isoladas a partir de suabe de carcaça. Coluna1 e 15- marcador Lambda DNA-PFGE.....49
- Figura 3- Eletroforese em campo pulsado-PFGE. Colunas 1 a 14 cepas de *C.perfringens* isoladas a partir de fezes.
Coluna 15- marcador Lambda DNA-PFGE.....50
- Figura 4- Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de PFGE com amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes e suabes de carcaças de suínos colhidos em abatedouro.....51
- Figura 5- Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de PFGE com amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes leitões sadios, matrizes, leitões com enterite e amostras de farinha de carne e osso.....52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Primers utilizados para detecção dos genes codificadores das Toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta 2 e enterotoxina.....	38
Quadro 2- Número de amostras isoladas relacionadas com o número de amostras analisadas e o número de perfis correspondente.....	44
Quadro 3- Descrição dos isolados de acordo com os perfis obtidos através da PFGE.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Aspectos gerais sobre o gênero <i>Clostridium</i>	18
2.2 Espécie <i>Clostridium perfringens</i>	19
2.3 Principais toxinas produzidas pela espécie <i>Clostridium perfringens</i>	20
2.3.1 Toxina Alfa	20
2.3.2 Toxina Beta	21
2.3.3 Toxina Épsilon	22
2.3.4 Toxina Iota	23
2.3.5 Toxina Beta-2	23
2.3.6 Enterotoxina	24
2.4 Infecção em Suínos	25
2.4.1 Patogenia	27
2.5 Infecção em Humanos	29
2.6 Caracterização genotípica	30
2.6.1 Eletroforese em gel de campo pulsado	31
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Material	34
4.1.1 Colheita das amostras	34
4.2 Método	35

4.2.1 Extração do DNA bacteriano.....	37
4.2.2 Detecção dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta-2 e enterotoxina através de PCR.....	37
4.2.3 Detecção do produto de amplificação (amplicon).....	38
4.2.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	39
4.2.4.1 <i>Protocolo de extração</i>	39
4.3 Determinação do Índice Discriminatório (ID)	40
4.4 Análise estatística dos fragmentos amplificados	41
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura nacional representa uma grande fonte de divisas tendo uma importante colaboração no estabelecimento de um saldo positivo na balança comercial. Dentro deste contexto a infecção por *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) pode causar graves prejuízos à indústria suinícola através da mortalidade de leitões infectados. Além das infecções em suínos o agente representa um grande risco à saúde humana, uma vez que é descrito como um dos agentes mais freqüentes nas toxinfecções de origem alimentar (KANAKARAJ et al., 1998).

A enterotoxemia e a enterite causadas por *C. perfringens* biotipo C e pelo biotipo A, respectivamente, têm sido amplamente descritas em criações de suínos. Estudos avaliando a epidemiologia molecular deste agente são escassos e a correlação entre as amostras de diferentes origens assim como a distribuição das mesmas nas criações intensivas não têm sido estudadas.

No presente estudo as amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes de suínos ao abate, de leitões com enterite, de leitões e matrizes saudáveis, suaves de carcaça, e farinha de carne e ossos foram caracterizadas quanto à presença dos genes codificadores das toxinas maiores através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e genotipicamente através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os perfis obtidos através do PFGE foram correlacionados com dados epidemiológicos de origem das amostras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre o gênero *Clostridium*

Bactérias do gênero *Clostridium* apresentam morfologia bacilar, são mesófilas em sua maioria, podem ser móveis ou imóveis e constituem o único gênero anaeróbio estrito com capacidade de formar esporos. São descritas oitenta e três espécies entre as patogênicas e as não patogênicas (LECLERC; MOSSEL, 1989).

As diferentes espécies de *Clostridium* podem ser identificadas pelo tamanho e forma da célula bacteriana, presença ou ausência de esporos, morfologia da colônia, características bioquímicas, presença de antígenos específicos e pela produção de toxinas (TAYLOR, 1999).

Os fatores de virulência produzidos pelas espécies do gênero, são as potentes toxinas extracelulares responsáveis pelas diferentes formas da doença no amplo leque de espécies suscetíveis (SONGER, 1996). Entre as doenças ocasionadas por bactérias deste gênero está o tétano, o botulismo, a gangrena gasosa e várias formas entéricas da doença (ROOD, 1998).

Esta bactéria é comumente encontrada em uma ampla variedade de alimentos, sendo que nas carnes em particular os esporos produzidos por ela sobrevivem a alguns processos de cozimento podendo causar intoxicações alimentares (BERRY ; GILBERT, 1991). Em 1946 Cravitz e Gilmore demonstraram

a importância do *C. perfringens* como causador de diarreias através da administração oral de culturas vivas em animais e humanos.

2.2 Espécie *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) é provavelmente a espécie mais difundida no solo e no conteúdo intestinal dos animais e do homem (HATHAWAY; JONHSON, 1998). Certamente esta é a espécie mais importante envolvida nas clostridioses entéricas de animais domésticos, as quais continuam a ser diagnosticadas na medicina veterinária, a despeito dos produtos imunoproláticos existentes (SONGER, 1996).

O *C. perfringens* produz um intimidante arsenal constituído por no mínimo 15 diferentes toxinas. De acordo com a capacidade de produzir as toxinas maiores o agente é classificado em diferentes biótipos, portanto, segundo a classificação atual do *C. perfringens* baseada na produção das toxinas alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) e iota (ι), ditas toxinas maiores. A toxina α é produzida por todos os biótipos e é a única toxina maior produzida pelo biotipo A. As amostras produtoras de toxina α e β recebem a classificação de biotipo C. As produtoras de toxinas α , β e ϵ são classificadas como biotipo B, enquanto as produtoras das toxinas α e ϵ caracterizam o biotipo D e as produtoras de α e ι , o biotipo E (HATHEWAY, 1990; MCCLANE et al., 2000).

Algumas amostras de *C. perfringens* também produzem uma enterotoxina (CPE) a qual é responsável pelos quadros de intoxicação em humanos. Este polipeptídeo de 3.5 KDa é codificado pelo gene *cpe* que pode ter localização cromossomal ou plasmidial (LUKINMAA et al., 2002).

2.3 Principais toxinas produzidas pela espécie *Clostridium perfringens*

2.3.1 Toxina Alfa

A toxina alfa, também denominada de fosfolipase C, é responsável pela hidrólise da membrana fosfolipídica dos eritrócitos, plaquetas, leucócitos, células endoteliais e musculares e também por outras formas de citotoxicidade (ELDER, 1957).

É a principal toxina envolvida na gangrena gasosa (AKTORIES; WEGNER, 1992), sendo produzida por quase todas as amostras de *C. perfringens*. Potencialmente letal para camundongos possuindo uma ação dermonecrótica e hemolítica (SONGER, 1996).

Recentemente, estudos vêm demonstrando seu importante papel na inibição da ação de macrófagos no sítio da infecção, possibilitando maior sobrevivência do agente nos tecidos dos hospedeiros (O'BRIEN; MELVILLE, 2004).

2.3.2 Toxina Beta

O gene *cpb*, codificador desta toxina, tem localização plasmidial e estudos através de métodos moleculares tem detectado sua presença apenas em amostras correspondentes aos biótipos B e C (SONGER, 1996).

A toxina beta foi originalmente purificada e parcialmente caracterizada por Sakurai e Duncan (1997). É uma toxina extracelular, com rápida inativação no trato gastrointestinal mediante a ação da tripsina (ROOD, 1998). A toxina é dermonecrótica para cobaias e potencialmente fatal para camundongos, sendo 2ng suficientes para causar necrose e 500ng/kg correspondente à dose letal para 50% dos indivíduos quando injetada pela via intravenosa em camundongos (MCDONEL, 1980).

A similaridade, ainda que pequena, das estruturas primárias das toxinas beta com a alfa e gama hemolisinas produzidas por *Staphylococcus aureus*, levou a especulações sobre a possível capacidade da toxina beta em formar poros nas membranas celulares, propriedade demonstrada para as toxinas produzidas pelo *S. aureus* (TWETEN, 2001). Apenas recentemente esse efeito foi demonstrado com relação a toxina beta, verificando-se a formação de poros com seletividade para cátions como sódio e potássio, em bicamadas de fosfatidilcolina e colesterol (SHATURSKY et al., 2000).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos de ação da toxina, seu papel nas toxinfecções por *C. perfringens* ainda é pouco esclarecido (TWENTEN, 2001). Apesar das alterações necróticas observadas em leitões

com diarreia associadas ao biotipo C, produtor de toxina beta, verificaram-se apenas efeitos neurológicos como resultados da alteração na distribuição de cátions através de membranas das células excitáveis (NILO, 1988; SHATURSKY et al., 2000).

Yamagishi (1987) utilizou coelhos para inoculação de amostras de *C. perfringens* e seus filtrados em alças intestinais ligadas, demonstrando a capacidade das amostras produtoras da toxina beta em promover desprendimento de células das vilosidades intestinais, hemorragia em mucosa, infiltrado de células inflamatórias e hiperplasia de tecido linfóide.

2.3.3 Toxina Épsilon

Esta toxina é codificada pelo gene *etx*, localizado em plasmídeos e identificado apenas em amostras dos tipos B e D (SONGER, 1996). Embora seu mecanismo de ação seja desconhecido, foram identificados efeitos dermonecróticos em cobaias e letalidade em camundongos. A toxina épsilon apresenta afinidade com as células epiteliais dos túbulos renais onde exerce efeito citotóxico sendo liberada na forma de uma prototoxina, que após a remoção proteolítica dos aminoácidos terminais apresenta aumento de aproximadamente mil vezes em sua toxicidade (SAKURAI; FUJII, 1987; SOLER-JOVER et al., 2004).

2.3.4 Toxina Iota

A toxina Iota é produzida como uma proto-toxina apenas por cepas de *C. perfringens* tipo E. Seu mecanismo de ação parece ter como alvo os monômeros de actina ocasionando a dissociação dos filamentos de actina e conseqüentemente modificação do citoesqueleto celular, induzindo disfunções na barreira e junções celulares (RICHARD et al., 1999).

2.3.5 Toxina Beta-2

Gibert et al. (1997) clonaram e sequenciaram a toxina β_2 a partir de cepas de *C. perfringens* tipo C isoladas de suínos com enterocolite necrótica. O gene responsável por sua codificação foi igualmente identificado em plasmídeos e recebeu a designação de gene *cpb-2* (GIBERT et al., 1997). A localização plasmidial do gene codificador foi evidenciada por Waters et al. (2003), em 100% de 35 amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes de leitões com diarreia utilizando a técnica de PFGE.

Essa toxina, uma proteína de 28 KDa, demonstrou letalidade quando inoculada em camundongos, com dose mínima de 3 μ g e citotóxica para células CHO e 1407 (JOLIVET- REYNAUD et al., 1986). Jolivet - Reynaud et al. (1986) e Gibert et al. (1997), encontraram resultados diferentes, quanto à dose necessária para produzir citotoxicidade, sendo esta variação atribuída à instabilidade da toxina,

que mesmo na presença de antiproteases durante o processo de purificação, demonstrou perda de atividade. Esta instabilidade com redução de atividade dificulta os estudos de seus efeitos, *in vivo* e *in vitro*

A toxina beta-2 difere da toxina beta em tamanho molecular e não apresenta homologia estrutural com nenhuma das outras toxinas produzidas pelo *C. perfringens*. Além disso, anticorpos produzidos para a toxina beta-1 não reagem com a toxina beta-2 (GIBERT et al., 1997).

2.3.6 Enterotoxina

A enterotoxina é produzida principalmente por cepas do tipo A, mas também pode ser produzida por cepas do tipo C e D. Seu mecanismo de ação é bem estudado e baseia-se na ligação da toxina às proteínas localizadas nas junções das diferentes células intestinais, levando a formação de poros cátion permeáveis nas membranas plasmáticas das células apicais. O gene *cpe*, codificador desta toxina pode estar localizado em plasmídeos e no cromossomo da bactéria, sendo que somente uma pequena porcentagem das amostras de *C. perfringens* são portadoras desse gene (BRYNESTAD; GRANUM, 2002).

Em condições naturais, a maior parte das amostras de *C. perfringens* capazes de produzir enterotoxina, não o fazem em quantidades críticas para causar intoxicação. No entanto, ao serem submetidas ao calor, fato usual na indústria e comércio alimentício, a produção de enterotoxinas chega a ser duas mil vezes maior do que na esporulação sob outras condições, provavelmente por

alterações no processo de regulação gênica, o que pode explicar a importante associação de amostras produtoras de enterotoxina às intoxicações de origem alimentar em humanos, em contraste com a sua menor participação nas doenças em animais domésticos (LECLERC; MOSSEL, 1989).

2.4 Infecção em Suínos

Nos suínos, o *C. perfringens* é considerado um agente primário causador de enterites necróticas hemorrágicas, classicamente associadas ao biotipo C e acometendo leitões com até duas semanas de idade. No entanto, outras formas de doença entérica são associadas a este agente, especialmente as enterocolites necróticas e as diarréias profusas, associadas ao biotipo A (COLLINS et al., 1989; SONGER; GLOCK, 1998). Nos casos onde este biotipo encontra-se envolvido as lesões hemorrágicas podem variar quanto à severidade, em comparação com os surtos relacionados ao biotipo C, sendo que alguns animais podem apresentar morte súbita (TAYLOR; BERGLAND, 1992).

Alguns autores classificam os casos de enterite necrótica em hiperagudos, agudos, subagudos e crônicos, segundo a severidade dos sinais clínicos (NILO, 1988). Nos quadros de enterite necrótica, quase sempre associados ao biotipo C, pode-se observar vômito, diarréia, sinais de dor abdominal e presença de sangue nas fezes, podendo ocorrer morte por obstrução intestinal ou toxemia (ROOD, 1998). O critério para o estabelecimento desta relação de causalidade tem sido o isolamento do agente, identificado em 11% dos

casos de diarreias em leitões lactentes nos Estados Unidos (YAMAGISHI et al., 1987). No entanto, Songer e Glock (1998), ao examinarem amostras isoladas de casos de enterites necróticas de leitões, identificaram 95% das amostras como biotipo A, ressaltando que este biotipo pode ser o responsável por grande parte destes casos.

Outras toxinas, além da toxina maior beta, parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento das doenças relacionadas ao agente, como por exemplo, a toxina beta-2 (SONGER; GLOCK, 1998). A toxina beta-2 parece estar relacionada a enterites necróticas em suínos e a enterocolites em eqüinos (SONGER, 1996; GIBERT et al., 1997). Seu envolvimento nos casos de doenças entéricas em suínos é provável, pois a presença do gene *cpb-2*, codificador da toxina foi detectada em 83% das amostras de *C.perfringens* isoladas de leitões com diarreia (GARMORY et al. 2000). Outro indício deste envolvimento é o grande número de casos de enterites relacionadas a amostras de *C.perfringens* do biotipo A, cuja toxina maior, a toxina alfa codificada pelo gene *cpa*, não parece ser capaz de produzir doença entérica em suínos (HATHEWAY, 1990; HERHOLZ, 1999; SONGER; GLOCK, 1998).

Alguns estudos indicam que o sobrenadante concentrado de culturas de amostras produtoras da toxina alfa não são capazes de induzir o acúmulo de fluido em alças ligadas de coelho, corroborando com a idéia de que a toxina alfa não desempenhe papel significativo, ao menos isoladamente, nos quadros entéricos (DUNCAN; STRONG, 1969; YAMAGISHI et al., 1987).

Damme-Jongsten et al. (1990), ao examinarem 75 amostras de *C. perfringens* biotipo A, isoladas de casos clínicos, excluíram uma possível

participação da toxina beta e enterotoxina uma vez que seus genes codificadores não foram detectados. Esta exclusão reafirma uma possível participação da toxina beta-2 na patogenia das enterites associadas ao biotipo A (GARMORY et al., 2000). Apesar da grande frequência de detecção do gene *cpb-2* em amostras do biotipo A, não deve ser esquecida sua ocorrência também em amostras do biotipo C, o que torna necessária a avaliação desta toxina nos quadros antes creditados apenas à ação da toxina beta (GIBERT, 1997).

Em virtude do aumento no número de relatos de casos de doença entérica relacionada ao biotipo A em suínos, constituindo números relevantes nos países europeus, Estados Unidos e em países africanos, fazem-se necessários estudos sistemáticos quanto à ocorrência de amostras deste biotipo portadoras do gene *cpb-2* (GARMORY et al., 2000). No Brasil, Moreno et al. (2003) descreveram a ocorrência de surtos de diarreia relacionados a amostras de *C. perfringens* biotipo A positivas para toxina beta-2 em quatro sistemas de produção de suínos com histórico de vacinação contra *E. coli* e *C. perfringens* biotipo C.

2.4.1 Patogenia

A infecção ocorre via oral através da ingestão do microrganismo presente nas fezes, no ambiente ou eventualmente em rações contaminadas. Para o biotipo A, as condições para a colonização e o aparecimento das alterações não são bem definidas, sabendo-se apenas que o agente estabelece-se muito precocemente, podendo ser encontrado nas primeiras fezes expelidas após a saída do mecônio,

sugerindo que as fêmeas exerçam um importante papel na perpetuação do agente no plantel (TAYLOR; BERGLAND, 1992).

Propriedades de adesão in vivo e in vitro de uma amostra pertencente ao biotipo A foram verificadas por Teixeira et al. (1999), devendo-se possivelmente a uma estrutura glicoprotéica que pode representar mais um importante fator de virulência nas doenças entéricas dos suínos. Amostras deste biotipo parecem também colonizar áreas com alterações pré-existentes (TAYLOR; BERGELAND, 1992).

O *C.perfringens* biotipo C não faz parte da microbiota normal dos suínos, não sendo encontrado com frequência em animais sadios, ao contrário do biotipo A, que pode estar presente na microbiota dos leitões já no primeiro dia de vida. Os fatores que propiciam a multiplicação do *C. perfringens* biotipo C com a subsequente produção de toxina não são bem esclarecidos, embora se conheça a capacidade do agente em colonizar rapidamente o trato digestivo na ausência de uma bem estabelecida microbiota (NIILO, 1988). Níveis baixos de tripsina, característicos do trato digestivo dos neonatos, acrescido da ação de substâncias anti-tripsina presentes no colostro conferem à toxina beta a possibilidade de manter-se na forma ativa por um período prolongado, aumentando o risco para os animais sob esta condição (NIILO, 1988; SONGER; GLOCK, 1998).

O diagnóstico da doença entérica por *C.perfringens* em suínos, é baseado no histórico do rebanho, nos sinais clínicos, no exame anatomopatológico, no isolamento do agente e na caracterização da amostra isolada (TAYLOR; BERGLAND, 1992). Nos casos de envolvimento do biotipo A, o diagnóstico deve ser cuidadoso, uma vez que este biotipo parece agrupar

amostras patogênicas, além de fazer parte da microbiota normal do intestino dos suínos (SONGER; GLOCK, 1998).

2.5 infecção em Humanos

Clostridium perfringens causa uma doença denominada gangrena gasosa em humanos, além de dois quadros muito diferentes de toxinfecção de origem alimentar: a clássica diarreia associada ao tipo A, a qual é mais freqüente no mundo industrializado, e a rara, mas muito mais severa enterite necrótica causada pelo tipo C (GRANUM, 1990).

Levando-se em consideração que o quadro de enterite clássica é o mais freqüentemente encontrado, o agente possui alguns atributos que contribuem significativamente em sua habilidade de causar infecções de origem alimentar em humanos: (1) a capacidade de formar esporos resistentes ao calor, (2) distribuição ubiquitária, (3) habilidade de se multiplicar rapidamente em alimentos sendo que algumas cepas apresentam a capacidade de produzir enterotoxina que leva aos sintomas característicos da infecção por *C. perfringens* tipo A (MCCLANE, 1996).

A infecção por *C. perfringens* enterotoxigênico ocorre quando o ser humano ingere um alimento que possua uma elevada carga contaminante do agente. Muitas células vegetativas de *C. perfringens* morrem sob o efeito da acidez do estômago, mas quando ingeridas em grande quantidade, algumas sobrevivem, multiplicando-se e esporulando no trato intestinal, sendo que neste último momento expressam o gene que codifica a enterotoxina. Após a síntese,

CPE acumula-se nas células em esporulação sendo eliminada quando a membrana celular se rompe para liberação do endosporo. No intestino a toxina se liga rapidamente a receptores no epitélio intestinal levando ao quadro de diarreia e aos outros sintomas associados a infecção pelo agente (MCCLANE, 1996).

Outros quadros não associados às infecções de origem alimentar têm sido descritos, levando as diarreias associadas ao uso de antibióticos ou a morte súbita em crianças devido a efeitos sistêmicos da toxina (LINDSAY, 1993).

2.6 Caracterização genotípica

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para a detecção dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta 2 e enterotoxina (KANAKARAJ, 1998). Considerando-se a excepcional correlação entre genótipo e fenótipo, praticamente não existindo genes codificadores de toxinas silenciosos, a PCR torna-se uma ferramenta diagnóstica de utilidade ainda maior (MEER; SONGER, 1997). Com exceção do gene codificador da enterotoxina e da toxina alfa, todos os outros genes codificadores de toxinas estão situados em plasmídeos (ROOD, 1998).

Estudos epidemiológicos têm sido realizados através da caracterização genotípica e fenotípica das bactérias do gênero *Clostridium* utilizando-se diferentes metodologias como uso de bacteriocinas, ribotipagem, análise de plasmídeos, PCR-ribotipagem, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Entretanto,

algumas destas metodologias não foram capazes de discriminar os diferentes genotipos (SCHALCH et al., 1999). Em relação à análise de amostras da espécie *C. perfringens* têm se destacado técnicas como a PFGE e o AFLP. A seguir a metodologia utilizada no presente trabalho será brevemente descrita.

2.6.1 Eletroforese em gel de campo pulsado

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada a metodologia padrão (*gold standard*) na caracterização molecular de agentes bacterianos (GOERING, 1993). A PFGE tem apresentado um poder de discriminação e identificação superior ao observado na utilização da ribotipagem em amostras de *C. perfringens* (MALANSKA et al., 1999).

Neste método são utilizadas enzimas de restrição que clivam o DNA com baixa frequência, gerando grandes fragmentos de DNA cromossomal os quais são separados através de uma eletroforese especial.

Uma vez que o DNA utilizado na PFGE precisa estar intacto, os processos convencionais de extração de DNA não podem ser utilizados. O isolamento do DNA na PFGE é realizado aplicando-se o agente bacteriano em blocos de agarose, que são submetidos ao tratamento com proteases, detergentes e lavagens para retirada dos contaminantes. O DNA contido no bloco é então submetido à digestão com enzimas de restrição selecionadas para a espécie bacteriana estudada. Os blocos de agarose contendo o DNA são então submetidos à eletroforese em campo pulsado.

Maslanka et al. (1999) descreveram a utilização de PFGE na caracterização de 62 amostras de *C. perfringens* isoladas de infecções de origem alimentar. Segundo estes autores, através da PFGE foi possível discriminar 17 perfis apresentando uma boa correlação com o local de origem das amostras.

3 OBJETIVOS

Considerando a importância do *C. perfringens* na indústria suinícola e seu potencial como causador de infecção de origem alimentar, o presente trabalho propõe:

- Isolamento de amostras de *C. perfringens* a partir de carcaças de suínos e fezes dos mesmos animais ao abate.
- Isolamento de amostras de *C. perfringens* a partir de intestino de leitões com enterite, fezes de leitões sadios, matrizes em lactação e amostras de farinha de carne.
- Caracterização das amostras de *C. perfringens* isoladas quanto à presença dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota beta 2 e enterotoxinas através da PCR.
- Padronização da PFGE para caracterização de amostras de *C. perfringens*.
- Análise das amostras de *C. perfringens* isoladas através da PFGE.
- Correlação dos perfis obtidos através da PFGE com os dados epidemiológicos das amostras.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

No presente trabalho foram analisadas amostras do conteúdo intestinal e suabes de carcaça de 120 suínos em quatro abatedouros localizados no Estado de São Paulo. Foram examinadas amostras de fezes de leitões saudáveis e suas respectivas mães provenientes de duas granjas, fezes de leitões doentes de diferentes origens e amostras de farinha de carne e ossos utilizados como fonte protéica em ração de suínos.

Estas amostras foram submetidas ao exame bacteriológico, sendo que as colônias com características morfológicas sugestivas de *Clostridium perfringens* foram analisadas através da PCR. Como controle positivo para as provas de PCR foram utilizadas amostras de *C. perfringens* biótipo A, B, C, D e E cedidas pela Dra. Lúcia Baldassi – Instituto Biológico de São Paulo.

4.1.1 Colheita das amostras

As amostras de fezes colhidas na linha de abate foram obtidas a partir de uma incisão na porção mediana do intestino grosso dos animais.

Os suabes foram realizados na região dorsal de toda a carcaça e acondicionados em meio de transporte (Lethin).

As amostras de fezes de fêmeas e leitões saudáveis foram coletadas a partir da ampola retal e assim como as amostras citadas acima foram acondicionadas em coletores plásticos estéreis. Todas as amostras acima mencionadas foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento.

As amostras de farinha de carne e ossos foram cedidas por empresas fabricantes de ração para suínos. As amostras de leitões doentes foram selecionadas da rotina do Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde o presente trabalho foi realizado.

4.2 Método

Todas as amostras de fezes foram semeadas em ágar sangue contendo suplemento antimicrobiano (SR 088 - Oxoid). As placas de ágar sangue foram incubadas em anaerobiose (anaerobac – Probac) a 37° C por 24 horas.

Os suabes foram previamente embebidos em meio Lethin para a redução da atividade de desinfetantes. Após a realização do esfregaço da região dorsal de toda a carcaça o suabe foi colocado em bolsa esterilizada com caldo Thyoglicolato (Difco-BBL).

Para o enriquecimento da amostra foram adicionados 200 µl do caldo Thyoglicolato (Difco-BBL) contendo amostra em caldo de carne cozida (Difco-BBL). Após a incubação neste meio por 24 horas, foi realizado o plaqueamento em ágar sangue contendo suplemento antimicrobiano (SR 088 - Oxoid), incubado a 37°C por 24 horas.

Cinco gramas de cada amostra de farinha de carne e ossos foram adicionadas em uma bolsa esterilizada com caldo Thyoglicolato (Difco-BBL). Antes da incubação a 37°C por 24 horas as bolsas foram mantidas a 70°C por 20 minutos para a redução de contaminantes. Após o período de incubação, as amostras foram semeadas em ágar sangue contendo suplemento de antimicrobiano (SR 088-Oxoid) e posteriormente incubadas em anaerobiose (anaerobac – Probac) a 37°C por 24 horas.

Após este último período de incubação as placas dos seis grupos de amostras (fezes, suabes, fezes de leitões e matrizes saudáveis, de leitões doentes e farinha de carne e ossos) foram analisadas e as colônias que apresentaram dupla hemólise foram avaliadas quanto à produção de catalase, lecitinase, gelatinase e fermentação da glicose, lactose e coagulação do leite desnatado para a classificação da espécie (QUINN et al., 1994). As amostras caracterizadas como *C. perfringens* foram estocadas em caldo de carne cozida (Difco-BBL) até o processamento. Para a extração do DNA bacteriano as amostras foram semeadas em 10 ml caldo Thyoglicolato e incubadas em anaerobiose (anaerobac – Probac) a 37°C por 24 horas.

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

Os cultivos bacterianos foram submetidos à lise em uma solução de proteinase K (20 mg/ml) e lisozima (100mg/ml) por uma hora a 37°C. A partir desse lisado, o DNA bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucléicos foi descrito por Boom et al. (1990).

4.2.2 Detecção dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta 2 e enterotoxinas através da PCR

A PCR foi realizada utilizando 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles dos *primers* específicos para a toxina pesquisada, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por quatro minutos seguido por 35 ciclos de um minuto à 94°C, um minuto à 55°C e um minuto à 72°C.

A sequência dos *primers* que foram utilizados para a detecção dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta 2 e enterotoxina está descrita no quadro 1.

Quadro 1- Primers utilizados para detecção dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta 2 e enterotoxina

Primer	Sequência (5'-3')	Gene alvo	Amplicon	Autor
beta2	GAA AGG TAA TGG AGA ATT ATC TTA ATG C	<i>cpb-2</i>	573 pb	Herholz et al, 1999
beta2	GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA TAT ACC			
PL3	AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC	<i>cpa</i>	283 pb	Fach e Popoff, 1997
PL7	ATA GAT ACT CCA TAT CAT CCT GCT			
CPB-F	GCG AAT ATG CTG AAT CAT CTA	<i>cpb</i>	196 pb	Hunter et al, 1993
CPB-R	GCA GGA ACA TTA GTA TAT CTT C			
ETX-F	GCG GTG ATA TCC ATC TAT TC	<i>etx</i>	655 pb	Hunter et al, 1992
ETX-R	CCA CTT ACT TGT CCT ACT AAC			
IA-F	ACT ACT CTC AGA CAA GAC AG	<i>ia</i>	446 pb	Perelle et al, 1993
IA-R	CTT TCC TTC TAT TAC TAT ACG			
CPE-F	GGA GAT GGT TGG ATA TTA GG	<i>cpe</i>	233 pb	Czeczulin et al, 1993
CPE-R	GGA CCA GCA GTT GTA GAT A			

4.2.3 Detecção do produto de amplificação (amplicon)

A detecção dos produtos de amplificação (10 µl do produto e 2 µl de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Após a corrida o gel foi corado em uma solução de Brometo de Etídio (5 µg/ml) por 15 minutos. O gel foi então fotografado através de luz ultra-violeta em um sistema de fotodocumentação convencional. Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcadores de pares de base 100 bp DNA Ladder (LGCbio).

4.2.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad).

Uma alíquota de 500 µl do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 foi incorporada a 500 µl de agarose 2% de baixo ponto de fusão e após homogeneização, transferida para moldes plásticos. Os blocos de agarose resultantes, contendo a amostra, foram então submetidos à lise *in situ*. O processo de extração envolve o preparo dos blocos por quatro dias, o qual está descrito a seguir:

4.2.4.1 Protocolo de Extração

1º dia - Foi adicionado 5ml de triton-EDTA (1% de triton, 0,05 M EDTA) aos blocos de agarose os quais foram posteriormente incubados por duas horas a 38°C. Passado este período os blocos foram mantidos por três horas em 5 ml de EDTA (0,5 M) a 38° C. No fim deste dia os blocos foram incubados a 37° C sob agitação com 5 ml da solução de Lise 1 (0,01M Tris –HCL, 1 M NaCL, 0,5% Sarcosyl, 1 mg de lisozima) e mantidos *over night*.

2º dia - Os blocos foram colocados em 2,5 ml de solução ESP (0,5 M EDTA com 1% sarcosyl) por uma hora a 4° C. Após este período foi adicionado a solução ESP proteinase K na concentração de 1 mg/ml e as amostras foram incubadas sob agitação a 37° C *over night*.

3º dia – Esta última solução foi descartada e as amostras incubadas a 48° C *over night* novamente com solução ESP (EDTA –Sarcosyl 1%) acrescentando 1 mg/ml de proteinase K.

4º dia - Os blocos foram lavados cinco vezes com tampão de eluição (TE) por 30 min a 4° C. Após estas lavagens os blocos foram mantidos a 4° C em 0,5 M EDTA até o processamento.

4.3 Determinação do Índice Discriminatório (ID)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$ID = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

onde N é o número de amostra da população teste, s é o número de diferentes tipo e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a

probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocadas em diferentes grupos.

4.4 Análise estatística dos fragmentos amplificados

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através do PFGE foi utilizado o programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System"). A similaridade das amostras será estimada através do coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte fórmula:

$$\text{Jaccard: } S_j = (a/n-d)$$

Onde a, b, c e d são possíveis de serem visualizados quanto ao seu significado na forma de uma tabela de frequência para os dois objetos α e β :

		α	
		+	-
β	+	a	b
	-	c	d

Sendo que, $n=u+m$ é o número total de bandas, $m=a+d$ é o número de bandas compartilhadas e $u=b+c$ é o número de bandas não compartilhadas.

Com a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), o qual foi representado pela forma de um dendrograma.

5 RESULTADOS

Dentre as 120 amostras de suabes de carcaça colhidos nos abatedouros, 53 foram positivas para o isolamento de *C. perfringens* (44,2%) e das 120 amostras de fezes 63 amostras foram positivas (52,5%) (Figura 1). Um total de 79 isolados foram selecionados para caracterização genotípica através da PFGE. Através da PCR todas as amostras foram caracterizadas como biotipo A, sendo que todas foram negativas para presença do gene codificador da enterotoxina e da toxina beta 2.

O número de amostras coletadas e o de isolados de cada abatedouro encontram-se descritos na tabela 1 a seguir.

Tabela 1- Número de amostras de suabes e fezes, coletados em quatro abatedouros de São Paulo e frequência de amostras positivas para *C. perfringens* – 2004.

Abatedouro	Suabes de carcaça		Amostras de fezes	
	Total (N)	Positivos N(%)	Total (N)	Positivos N(%)
Abatedouro 1	30	20(67,7)	30	22 (73,3)
Abatedouro 2	30	0	30	10 (33,3)
Abatedouro 3	30	6 (20)	30	13 (43,3)
Abatedouro 4	30	27 (90)	30	18 (60)
Total	120	53 (44,2)	120	63 (52,5)

Figura 1- Frequência de suabes de carcaça e amostras de fezes positivas para isolamento de *C. perfringens*

Das 90 amostras de farinha de carne e ossos provenientes de diferentes frigoríficos do país, 29 foram positivas para o isolamento de *C. perfringens* (32,2%). Dessas 29 amostras positivas foram selecionadas 51 colônias para caracterização genotípica. Através da PCR 12 amostras foram classificadas com biotipo C e 39 como biótipo A. Todas foram negativas para presença do gene codificador da enterotoxina e toxina beta 2.

As 17 colônias provenientes de oito casos de enterite foram caracterizadas através da PCR como biotipo A positivos para toxina beta-2. Foram examinadas 30 amostras de fezes de leitões e fêmeas sem sinais clínicos de enterite

provenientes de duas granjas, sendo isoladas 20 colônias provenientes das amostras dos leitões e 20 colônias de matrizes da granja A e da granja B, todas biotipo A, beta 2 positivo.

Para aplicação da técnica proposta (PFGE) foram selecionadas 126 cepas, sendo 48 provenientes de fezes colhidas em abatedouros, 31 provenientes de suaves de carcaça, 16 cepas de leitões doentes, 10 cepas de matrizes saudáveis, 14 cepas de leitões saudáveis e 7 cepas de farinha de carne e ossos (Quadro 2).

Quadro 2- Número de amostras isoladas relacionadas com o número de amostras analisadas e o número de perfis correspondente.

Origem da amostra	Amostras isoladas	Amostras analisadas
Abatedouro 1 - suave carcaça	20	10
Abatedouro 1 – fezes	22	26
Abatedouro 2 - suave carcaça	0	0
Abatedouro 2 – fezes	10	0
Abatedouro 3 - suave carcaça	6	6
Abatedouro 3 – fezes	13	13
Abatedouro 4 - suave carcaça	27	15
Abatedouro 4 – fezes	18	9
Farinha de carne	51	7
Leitões com enterite	17	16
Leitões sem enterite	20	14
Fêmeas sem sintomas	20	10
Total	217	126

Com o objetivo de discriminar os isolados obtidos foi empregada a técnica de PFGE, a qual apresentou índice discriminatório igual a 0,98. Exemplos dos resultados obtidos são apresentados nas figuras 2 e 3.

Através da análise das amostras testadas para o PFGE, foram encontrados 97 perfis designados de P1-P97, cada perfil gerou entre 2 e 10 fragmentos de DNA (bandas) entre aproximadamente 48.5 e 727,5 kb. Os perfis encontrados foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda.

A partir do PFGE foram criados os dendrogramas apresentados nas figuras 4 e 5. Na figura 4 foi analisada a correlação entre as amostras isoladas de fezes e de suabes dos abatedouros. Na figura 5 foram correlacionadas às amostras isoladas de fezes de matrizes e leitões saudáveis, fezes de leitões com enterite e farinha de carne.

No primeiro dendrograma (Figura 4) pode-se observar dois agrupamentos principais Ia e Ib. O grupamento Ia apresentou 56 perfis, ou seja, a maior parte dos isolados. O subgrupo Ib juntamente com o IIb reuniu a maioria dos isolados provenientes de suabes de carcaça do abatedouro quatro.

No grupamento Ia, alguns subgrupos chamam a atenção por reunirem amostras de mesma origem. Alguns exemplos deste tipo de grupamento são o Va que reúne todas as amostras provenientes de suabes de carcaça do abatedouro um e algumas do quatro e o subgrupo IVa que reúne isolados de amostras de fezes do abatedouro três.

Subgrupos com grande número de perfis como o VIa destacaram-se por agrupar isolados provenientes em grande parte de amostras de fezes do abatedouro um, ainda que alguns isolados de fezes do abatedouro três e quatro estejam presentes e dois isolados de suabes apresentem alta similaridade com algumas amostras deste grupo.

No segundo dendrograma (Figura 5), foram incluídas para comparação as amostras de farinha de carne, de matrizes, leitões saudáveis e amostras de leitões com enterite. Nesse dendrograma observam-se dois agrupamentos principais Ia e Ib com 20% de similaridade entre si. O subgrupo Ia reuniu apenas amostras provenientes de leitões doentes com alta similaridade entre os isolados (> 50 %). O subgrupo Ib reuniu 30 isolados de origens variadas, destacando-se os agrupamentos IIIa que reúne apenas amostras provenientes de leitões sadios, o IIIc que agrupa apenas amostras isoladas de matrizes e o IIId que reúne amostras de farinha de carne e ossos. Observa-se no agrupamento IIIb amostras de farinha de carne e ossos similares a um isolado de leitão doente, um isolado de leitão sadio e um isolado de matriz. É possível verificar neste dendrograma que alguns isolados de leitões sadios foram agrupados próximos a amostras de matrizes, no entanto, o índice de similaridade foi inferior a 60%.

Quadro 3- Descrição dos isolados de acordo com os perfis obtidos através do PFGE (continua)

PERFIL	AMOSTRAS	ORIGEM	MATERIAL
P1	A1S1	Abatedouro 1	Suabe de carcaça
P2	A1S2;A1S3	Abatedouro 1	Suabe de carcaça
P3	A1S4; A1S4; A1S5;A1S6; A1S7; A1S8; A4S13; A4S14; A4S15	Abatedouro 1 e 4	Suabe de carcaça
P4	A1S9; A1S10	Abatedouro 1	Suabe de carcaça
P5	A3F9	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P6	A3F13	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P7	A3F10	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P8	A1F2;A1F3	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P9	A3S1	Abatedouro 3	Suabe de carcaça
P10	A1F13	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P11	A3F12	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P12	A4S8	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P13	A4F8	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P14	A4f9	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P15	A1F5; A1F6	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P16	A1F10	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P17	A1F11	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P18	A1F14	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P19	A1F4	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P20	A4F1	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P21	A4F7	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P22	A4F2; A4F3	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P23	A4F4	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P24	A4F5; A4F6	Abatedouro 4	Fezes de terminados
P25	A1F17	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P26	A1F19	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P27	A1F21; A1F23	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P28	A1F25	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P29	A1F7	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P30	A1F8	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P31	A4S12	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P32	A1F18	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P33	A1F20	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P34	A1F24	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P35	A1F26	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P36	A4S1	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P37	A4S2; A4S3	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P38	A1F1	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P39	A1F15	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P40	A1F16	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P41	A3F1	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P42	A3F2	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P43	A3F3	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P44	A3F4	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P45	A3S2	Abatedouro 1	Suabe de carcaça
P46	A3S3;	Abatedouro 3	Suabe de carcaça
P47	A3F11	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P48	A3S4; A3S5	Abatedouro 3	Suabe de carcaça

Quadro 3 - Descrição dos isolados de acordo com os perfis obtidos através do
PFGE (continuação)

PERFIL	AMOSTRAS	ORIGEM	MATERIAL
P49	A3F8	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P50	A3F5	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P51	A3F6	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P52	A3F7	Abatedouro 3	Fezes de terminados
P53	A1F9	Abatedouro 1	Fezes de terminados
P54	A1F12	Abatedouro 1	Fezes de terminados
p55	A4S9	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P56	A4S10; A4S11	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P57	A4S4; A4S5	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P58	A4S7	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P59	A4S6	Abatedouro 4	Suabe de carcaça
P60	G3L13	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P61	G2L8	Granja 2	Fezes de leitões sadios
P62	G3L28	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P63	G2L5	Granja 2	Fezes de leitões sadios
P64	G3L15	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P65	G3L7	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P66	G3L18	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P67	G3L16	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P68	G3L12	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P69	G3M14	Granja 3	Fezes de matriz
P70	G3M11	Granja 3	Fezes de matriz
P71	LD5; LD6; LD7; LD8	Granja	Fezes de leitões doentes
P72	G3M13	Granja 3	Fezes de matriz
P73	G3L14	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P74	LD1	Granja	Fezes de leitões doentes
P75	FC5	Frigorífico	Farinha de carne
P76	FC6; FC7	Frigorífico	Farinha de carne
P77	G3M17	Granja 3	Fezes de matriz
P78	G3M22	Granja 3	Fezes de matriz
P79	G3L9	Granja 3	Fezes de leitões sadios
P80	G3L10; G3L17; G3M11	Granja 3	Fezes matriz/leitões sadios
P81	G3M19	Granja 3	Fezes de matriz
P82	LD2	Granja	Fezes de leitão doente
P83	G3M15	Granja 3	Fezes de matriz
P84	G3M16	Granja 3	Fezes de matriz
P85	LD3; FC2	Granja, Frigorífico	Fez. leitão doente/F. carne
P86	FC3	Frigorífico	Farinha de carne
P87	FC1	Frigorífico	Farinha de carne
P88	FC4	Frigorífico	Farinha de carne
P89	G2L2	Granja 2	Fezes de leitões sadios
P90	LD9	Granja	Fezes de leitão doente
P91	LD10	Granja	Fezes de leitão doente
P92	LD11	Granja	Fezes de leitão doente
P93	LD12	Granja	Fezes de leitão doente
P94	LD15; LD16; LD17	Granja	Fezes de leitão doente
P95	LD13; LD14	Granja	Fezes de leitão doente
P96	G3M21	Granja 3	Fezes de matriz
P97	G3M12	Granja 3	Fezes de matriz

Figura 2- Eletroforese em campo pulsado- PFGE. Colunas 2 a 14 - cepas de *C.perfringens* isoladas a partir de suabe de carcaça. Coluna 1 e 15 - marcador Lambda DNA-PFGE.

Figura 3- Eletroforese em campo pulsado - PFGE. Colunas 1 a 14 - cepas de *C.perfringens* isoladas a partir de fezes. Coluna 15 - marcador Lambda DNA-PFGE.

Figura 4 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de PFGE com amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes e suabes de carcaças de suínos colhidos em abatedouro.

Figura 5 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de PFGE com amostras de *C. perfringens* isoladas de fezes leitões saudáveis, matrizes, leitões com enterite e amostras de farinha de carne e osso.

6 DISCUSSÃO

Clostridium perfringens é um microorganismo comumente encontrado e isolado de diferentes fontes (CANO et al., 2000) com potencial para causar surtos de sérias doenças como a mionecrose, enterotoxemia, colangio-hepatite e enterite necrótica tanto em humanos como em animais (ROOD, 1998; SONGER, 1996).

O quadro entérico observado em humanos é causado pela enterotoxina produzida durante a esporulação do agente, e o veículo desta infecção é geralmente a carne de origem suína, bovina ou aviária (MCCLANE, 2001).

Surtos envolvendo *C. perfringens* geralmente estão relacionados a infecções alimentares e envolvem um grande número de indivíduos podendo espalhar-se rapidamente em escolas, fábricas e outras instituições. A rápida detecção e identificação do patógeno envolvido é a chave para o controle destes surtos (MASLANKA et al., 1999; TRESCH et al., 1999).

Devido à importância deste agente como causador de infecções em humanos e a inexistência de dados atuais sobre a frequência deste mesmo agente em carne suína, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a presença de *C. perfringens* em carcaças de suínos em abatedouros e em amostras de fezes dos mesmos animais. Os isolados obtidos foram caracterizados quanto à presença de genes codificadores das toxinas maiores.

Dentre os quatro abatedouros visitados três apresentaram contaminação de carcaça pelo *C. perfringens*, o que indica o potencial do agente em contaminar a carne destinada ao consumo. Em um dos abatedouros, o qual possui a capacidade de abate de 300 cabeças por dia não foi isolada nenhuma amostra de

C. perfringens a partir dos suabes de carcaça. Este local estava em funcionamento há poucos meses e apresentava uma linha de abate em ótimas condições de higiene, o que provavelmente reduziu as possibilidades de contaminação.

No presente trabalho observou-se uma alta frequência de isolamento do agente. A partir das carcaças sendo que *C. perfringens* foi isolado em 37,5% (45/120) das amostras e a eliminação do agente nas fezes foi observada em 52,5% (63/120) dos animais. No entanto, todas as amostras foram negativas para presença do gene codificador de enterotoxina. A maior parte dos relatos de isolamento e caracterização de isolados de *C. perfringens* em amostras de carne ou fezes de suínos realizada nos últimos anos reporta uma frequência de 0 a 6% de amostras positivas para enterotoxina (LIN; LABBE, 2003). Todas as amostras isoladas foram classificadas como biótipo A, negativas para presença do gene codificador da toxina beta 2.

O desenvolvimento da doença em suínos depende da ingestão do microorganismo presente nas fezes, no ambiente e eventualmente em rações contaminadas. As condições para a colonização e o aparecimento de alterações relacionadas ao biótipo A não são bem definidas, sabendo-se apenas que o agente estabelece-se muito precocemente, podendo ser encontrado nas primeiras fezes expelidas após a saída do mecônio, sugerindo que as fêmeas exerçam um importante papel na perpetuação do agente no plantel (TAYLOR; BERGLAND, 1992).

Em casos de enterite onde o biótipo A está envolvido, deve-se contar com maiores cuidados ao se realizar o diagnóstico, uma vez que este biótipo parece

agrupar amostras patogênicas e amostras que fazem parte da microbiota normal do intestino dos suínos (SONGER; GLOCK, 1998). No presente trabalho foram caracterizadas genotipicamente amostras de *C. perfringens* isoladas a partir de animais com enterite. Estes animais foram submetidos a pesquisa de outros agentes causadores de enterite como *E. coli* toxigênica, Rotavirus e *Isospora suis* na rotina de diagnóstico do Laboratório de Sanidade Suína- FMVZ-USP. As amostras oriundas de casos em que não havia outro agente envolvido e havia lesões histopatológicas compatíveis foram incluídas no trabalho. Todas as amostras de leitões com enterite foram classificadas como biótipo A, positivo para o gene codificador da toxina beta-2.

Outro grupo de amostras avaliadas foi composto por isolados de leitões sem sinais de enterite e suas mães. O principal objetivo da análise destas amostras foi comparar estes isolados com os obtidos em leitões com o quadro de enterite causado por amostras biótipo A. Todas as amostras isoladas de leitões sem enterite e matrizes foram classificadas como biótipo A, positivas para toxina beta-2.

A alta frequência do gene codificador da toxina beta-2 em leitões com enterite, sem sinais de enterite e matrizes cria mais dúvidas sobre a real importância desta toxina na ocorrência das infecções intestinais. Garmory et al. (2000) e Waters et al.(2003), não detectaram a presença do gene codificador da toxina beta-2 nos isolados pesquisados de amostras de fezes de animais sem diarreia. A divergência entre os resultados poderia estar relacionada às diferenças geográficas das regiões estudadas e ao número reduzido de amostras de fezes (13 amostras no total) de leitões sem diarreia estudados por estes autores.

Com a finalidade de verificar a interferência das rações que utilizam farinha de carne e ossos na colonização intestinal dos animais de terminação e de reprodutores, foi realizada a pesquisa do agente em amostras de farinha de carne e ossos. No presente estudo, foi isolado *C. perfringens* biotipo A e C em farinha de carne e ossos, sendo todas as amostras negativas para o gene codificador da toxina beta-2. O agente foi isolado em 32,2% das amostras avaliadas, sendo que não há relatos da frequência deste agente neste tipo de amostra. O Ministério da Agricultura preconiza a contagem de *C. perfringens* em alimentos e subprodutos de origem animal, no entanto não há normas nem maiores informações quanto a pesquisa de toxinas produzidas pelo agente.

Os isolados obtidos nos diferentes tipos de amostras foram submetidos a genotipagem através da técnica de PFGE. Métodos de tipagem molecular como PFGE possuem alta capacidade de diferenciação, sendo capazes em muitos casos de diferenciar cepas não relacionadas, como aquelas que são geograficamente distintas do organismo de origem, e ao mesmo tempo demonstrar a relação de organismos isolados de um mesmo indivíduo infectado através da mesma fonte.

No primeiro dendograma que analisa os perfis obtidos nos abatedouros, os isolados de suaves de carcaça, de modo geral apresentaram menor variabilidade genética, apresentando um maior número de amostras clonais como se pode observar nos perfis dois, três e quatro (P2, P3 e P4). Os isolados de fezes apresentaram um número maior de perfis e uma maior variabilidade genética. Observa-se que através da PFGE, alguns agrupamentos reuniram amostras de suave e amostras de fezes de acordo com o abatedouro de origem. Alguns

isolados de suabes apresentaram graus mais elevados de similaridade em relação a isolados de fezes. Este dado associado a baixa variabilidade das amostras de suabes pode indicar a possibilidade de uma fonte comum para contaminação da carcaça com cepas de origem fecal, seja no momento da escalda ou em algum outro ponto de manipulação da mesma, levando ao predomínio de alguns clones.

No segundo dendograma foram analisadas as amostras isoladas de leitões sadios, de matrizes e farinha de carne e ossos. Neste caso observa-se a formação freqüente de agrupamentos de mesma origem como ocorre no grupamento IIIa que reúne apenas amostras de leitões sadios, no Ia que reúne apenas amostras de leitões com enterite e no IIc que agrupa amostras de matrizes. A distribuição das amostras não deixa clara a participação das matrizes na contaminação dos leitões com enterite pelo *C. perfringens* nem na colonização intestinal dos leitões sadios como é sugerido na literatura citada anteriormente (TAYLOR; BERGLAND, 1992).

As amostras isoladas de farinha de carne e ossos foram agrupadas próximas de algumas amostras de matrizes e de leitões com enterite, sendo que no perfil 85 do dendograma II observa-se uma amostra de farinha de carne idêntica a uma amostra de leitão com enterite. Estes dados sugerem que a farinha de carne e ossos utilizada na alimentação dos animais pode estar carreando cepas de *C. perfringens* para os suínos. Da mesma forma, a contaminação da farinha de carne e ossos pode estar sendo originadas por carcaças contaminadas com o agente, utilizadas para a produção deste insumo, fechando um ciclo epidemiológico de disseminação da bactéria.

A localização da maioria dos genes codificadores de toxinas em elementos extracromossomais provavelmente influencia a diversidade da espécie *C. perfringens*. A presença de elementos genéticos móveis como os transposons, seqüências de inserção, bacteriófagos e plasmídeos podem aumentar a variabilidade dentro dos perfis gerados através do PFGE (GURTLE; MAYALL, 2001).

No presente trabalho 8% dos isolados não se mantiveram viáveis no meio de armazenamento empregado e não puderam ser avaliados através da PFGE. Um total de 10% dos isolados não apresentaram um padrão possível de se analisar através desta técnica. A impossibilidade de obtenção de perfis em isolados de *C. perfringens* é descrita por diversos autores e varia de 5 a 10% das amostras segundo a literatura consultada (JOHANSSON et al., 2006; MASLANKA et al., 1999). A ausência de padrão no PFGE pode estar relacionada a diferentes fatores como, por exemplo, a presença de DNases resistentes ao processo de extração, que levariam a degradação do DNA antes da eletroforese, outra possibilidade seria a ausência de sítios de restrição para a enzima testada.

A freqüência de estudos encontrados na literatura descrevendo a aplicação em grande escala dos métodos de tipagem molecular é baixa. Os resultados do presente estudo fornecem várias informações a respeito da distribuição, circulação e variabilidade genética do *C. perfringens* em sistemas de produção de suínos. No entanto, muitas questões ainda permanecem sem respostas tornando necessários estudos mais amplos para confirmar os resultados aqui obtidos e aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia molecular do agente.

7 CONCLUSÕES

- ❖ *Clostridium perfringens* foi isolado em um percentual alarmante em carcaças de suínos (44,2%), apesar da ausência de amostras positivas para presença de enterotoxina.
- ❖ O PFGE apresentou um alto índice discriminatório para tipagem de amostras de *C. perfringens* testadas.
- ❖ Amostras isoladas de carcaças apresentaram grande similaridade em relação as amostras de origem fecal.
- ❖ Isolados de Farinha de carne apresentaram perfis similares aos obtidos em isolados de fezes de fêmeas, leitões sadios e leitões com enterite, sugerindo que este insumo seja uma importante fonte de contaminação para os animais sadios.
- ❖ Isolados de leitões com e sem enterite apresentaram baixa similaridade com isolados de fêmeas, sugerindo que a principal fonte de contaminação de leitões recém nascidos pode não ser a mãe.

REFERÊNCIAS

AKTORIES, K.; WEGNER, A. Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP ribosylating toxins. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 2905-2908, 1992.

BERRY, P.R.; GILBERT. *Clostridium Perfringens* type A food poisoning. In: DUERDEN, B.I., DRASER, B.S. (Ed.), **Anaerobes in Human Disease**, London: Arnold, p.362-371, 1991.

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

CANO, R. J. ; TIEFENBRUNNER, F.; UBALDI, M.; DEL CUETO, C.; LUCIANI, S.; COX, T.; ORKANDO, P.; KUNZEL, K.H.; ROLLO, F.; Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. **American Journal Physical Anthropology** , v.112,p. 297-309, 2000.

COLLINS, J. E.; BERGELAND, M. E.; BOULEY, D.; DUCOMMUN, A. L.; FRANCIS, D. H.; YESKE, P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. **Journal of Vet Diagnostic Investigation**, v.1, p.351-353, 1989.

DAMME-JONGSTEN, M.; HAAGSMA, J.; NOTERMANS, S. Testin strains of *Clostridium perfringens* type A isolated from diarrhoeic piglets for the presence of the enterotoxin gene. **Veterinary Record**, v. 24, p. 191-192, 1990.

DESAI, M.; TANNA, A.; WALL, R.; EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R.; STANLEY, J. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group A streptococcal invasive disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3133-3137, 1998.

DUNCAN, C. L.; STRONG, G. H. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, p. 86-94, 1969.

ELDER, J. M.; MILES, A. A. The Action of the lethal toxins of gas gangrene clostridia on capillary permeability. **Journal of Pathology and bacteriology**, v.74, p. 133-145, 1957.

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

GIBERT, M.; RENAUD, C. J.; POPOFF, M. R. Beta-2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. **Gene**, n. 203, p. 65-73, 1997.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of cromossomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 14, p. 595-600, 1993.

GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. **International Journal Food Microbiology**, v. 10, p. 101-112, 1990.

GÜRTLER, V., MAYALL, B. Genomic approaches to typing taxonomy and evolution of bacterial isolates, **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 3-16, 2001

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

HATHEWAY, C. L.; JONHSON, E. A.; *Clostridium*: the sporebearing anarobes. In: BALOWS, A., DUERDEN, B. I. (Ed.), *Systematic Bacterioogy*, Topley and Wilson's **Microbiology and Microbial Infections**, London: Arnold, v.2, p.731-782, 1998.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of beta – 2 toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 358-361, 1999.

JOHANSSON, A.; ASPAN, A.; BAGGE, E.; BAVERUD, V.; ENGSTROM, B. E.; JOHANSSON, K. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 47, 2006.

JOLIVET-REYNAUD, C.; POPOFF, M. R.; VINIT, M. A.; RAVISSE, P.; MOREAU, H.; ALOUF, J. E. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* beta toxin and other clostridial toxins. **Zentralbl-Bakteriol**, v. 15, p. 145-151, 1986.

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

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A. **Microbiologie du tube digestif, eau et les aliments**. Paris: Doin, 1989. 525 p.

LIN, Y. T.; LABBE, R. Enterotoxigenicity and Genetic Relatedness of *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Foods in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1642-1646, 2003.

LINDSAY, J.; MACH, A.; WILKINSON, M.; MARTIN, L.; WALLACE, L.; KELLER, F.; WOJCIECHOWSKI, M. *Clostridium perfringens* type A cytotoxic-enterotoxin(s) as triggers for death in sudden infant death syndrome: development of a toxico-infection hypothesis. **Current Microbiol**, v. 27, p. 51-59, 1993.

LUKINMAA, S.; TAKKUNEN, E.; SIITONEN, A. Molecular Epidemiology of *Clostridium perfringens* Related to Food-Borne Outbreaks of Disease in Finland from 1984 to 1999. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3744-3749, 2002.

MASLANKA, S. E.; KERR, J. G.; WILLIAMS, G.; BARBAREE, J. M.; CARSON, L. A.; MILLER, J. M.; SWAMINATHAN, B. Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis to facilitate food-borne disease outbreak investigations. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 2209-2214, 1999.

MCCLANE, B. *Clostridium perfringens*, In: DOYLE, M; BCUCHAT, L.; MONTIVILLE, T. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. Washington , D.C: American Society for Microbiology, p.351-352..

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

MCCLANE, B. A.; LYERLY, D.; WILKINS, T.; Enterotoxic Clostridia. In: V. A. FISCHETTI N, R., FERRETI, J., PORTNOY, D., ROOD, J. (ed) **Gram-Positive Pathogens**. ASM Press, Washiton, D. C.: 2000.

MCDONEL, J. L. Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D and E). **Pharmacology Theratology**, v. 10, p. 617–635, 1980.

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

MORENO, A. M., BACCARO, M. R. FERREIRA. A. J. P., HIROSE F. H., CAMPOS, D. S. Detection of the $\beta 2$ toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. **Arquivo do Instituto Biologico**. V.70, n. 2, p. 155-158, 2003.

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

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. Effects of clostridium perfringens alpha toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity of macrophages, on escape from phagosomes of macrophages and on persistence of C. Perfringens in host tissues. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p.5204-5215, 2004.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. (Eds) **Clinical veterinary microbiology**, London: Wolfe, 1994. 648 p.

RICHARD, J. F.; PETIT, L.; GIBERT, M.; MARVAUD, J. C.; BOUCHAUD, C.; POPOFF, M. R. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. **International Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 185-194, 1999.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual review of microbiology**, v. 52, p. 333-360, 1998.

SAKURAI, J.; FUJII, Y. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin. **Toxicon**, v. 25, p. 1301-1310, 1987.

SCHALCH, B.; SPERNER, B.; EISGRUBER, H.; STOLLE, A. Molecular Methods for analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, p. 281-286, 1999.

SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, H.; SONGER, J. G.; TWENTEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation selective channels in lipid bilayers. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5546-5551, 2000.

SOLER-JOVER, A.; BLASI, J.; GOMEZ DE ARANDA, I.; NAVARRO, P.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R.; MARTIN-SATUE, M. Effect of epsilon toxin GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 7, p. 931-942, 2004.

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

SONGER, J. G.; GLOCK, R. D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. **Swine Health and production**, v. 6, n. 5, p. 223-225. 1998.

TAYLOR, D. J. Clostridial Infections. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, J. D. (Ed.) **Diseases of swine**, 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 395-412.

TAYLOR, D. J.; BERGLAND, M. E. Diseases of swine, In: LEMAN, A. D., STRAW, B. E., MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S. D.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**, 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p. 454-460.

TEIXEIRA, E. P., SERAFIM, M. B., HOFLING, M. A. C., YAMADA, A. T., CASTRO, A. F. P. Adhesive properties of na outer structure of *Clostridium perfringens* type A isolated from piglets with catarral enteritis. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 242-248, 1999.

TROECH, A.; NGUYEN, H.; MIYANDA, C. G.; DESVARENNE, S.; GINGERAS T. R.; KAPLAN, P. M.; CROS, P.; MABILAT, C. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p.49-55, 1999.

TWEETEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and clostridium septicum alpha toxin: their mecanismos and possible role in pathogenesis. **Veterinary microbiology**, v. 82, p. 1-9, 2001.

WATERS, M.; SAVOIE, A.; GARMORY, H.S.; BUESCHEL, D.; POPOFF, M. R.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W.; Mc CLANE, B. A.; SARKER, M. R. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3584-3591, 2003.

YAMAGISHI, T.; GYOBU, Y.; SAKAMOTO, K.; ISHISAKA, S.; SAITO, K.; MORINAGA, S. KATSUDA, S.; UMEI, T.; KONISHI, K. Response of ligated ileal loop to *Clostridium perfringens* type C strains and their toxic filtrates. **Microbiology and Immunology**. v. 31, p. 859-868, 1987.