

**COMPARAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO
(ESTERASE) DE CEPAS DE *Clostridium perfringens*
DE ORIGEM BOVINA E AVIÁRIA**

KAREN AVILEZ DE ANDRADE

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Prática de Saúde
Pública, Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Grau de Mestre em Saúde
Pública.

Área de Concentração:
Serviços de Saúde Pública

Orientador:
Prof. Dr. Gláucio Rogério Matte

São Paulo

2003

**AUTORIZO, EXCLUSIVAMENTE PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS, A
REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TESE, POR PROCESSOS
... FOTOCOPIADORES.**

KAREN AVILEZ DE ANDRADE

Data da defesa: 05/05/2003

**COMPARAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO
(ESTERASE) DE CEPAS DE *Clostridium perfringens*
DE ORIGEM BOVINA E AVIÁRIA**

KAREN AVILEZ DE ANDRADE

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Prática de Saúde
Pública, Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Grau de Mestre em Saúde
Pública.

Área de Concentração:
Serviços de Saúde Pública

Orientador:
Prof. Dr. Glauco Rogério Mattê

São Paulo

2003

*AUTORIZO, EXCLUSIVAMENTE PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS, A
REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TESE, POR PROCESSOS
FOTOCOPIADORES.*

KAREN AVILEZ DE ANDRADE

Data da defesa: 05/05/2003

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Ao meu orientador Dr. Glavur Rogério Matté, pela paciência e disponibilidade em me orientar;

A Dra. Erna Elisabeth Bach química e Pesquisadora Científica da Seção de Biotecnologia do Instituto Biológico, atualmente professora da Universidade Camilo Castelo Branco e orientadora junto a UNESP-Araraquara-Biotecnologia, que me ofereceu estágio no Instituto Biológico e me auxiliou na interpretação dos resultados;

A Dra. Lucia Baldassi médica veterinária e Pesquisadora Científica da Seção de Bacteriologia Geral e Micobacterioses do Instituto Biológico, quem considero minha segunda mãe, pois me acolheu no laboratório, me ensinou tudo que hoje eu sei, me incentivou e me auxiliou durante todo o desenrolar do meu trabalho;

A Dra. Rosa Maria Piatti Pesquisadora Científica da Seção de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico que disponibilizou seu tempo para realizar comigo a estimativa de concentração de proteínas;

A Dra. Eliana Roxo que permitiu que eu utilizasse o laboratório de Biologia Molecular para realização das corridas dos géis;

A Dra. Ercília M. B. Calil pela companhia que me fez durante a realização deste trabalho e pela preocupação que teve comigo nos momentos finais desse trabalho;

A todos os estagiários da Seção de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico, principalmente a Juliana Terzi Maricato;

A Seção de Viroses de bovídeos e ao estagiário Odair a quem tantas vezes incomodei solicitando nitrogênio líquido;

A Dra. Josete Garcia Bersano Pesquisadora Científica e todos do Laboratório de Suínos que me disponibilizaram o uso da centrífuga;

A todos no Instituto Biológico que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho;

A Diretoria do Instituto Biológico que permitiu a realização deste trabalho;

Ao meu tio Waltair Sathler de Andrade, que sempre me deu incentivo, pois quando criança eu desenhei uma baleia na capa do seu livro de neuro-anatomia;

A todos os meus amigos, em especial a minha amiga Elizangêla que foi meu colo durante os dias difíceis. Obrigada pelas orações, conselhos e consolo;

A minha irmã e amiga Silvia com quem por diversas vezes desabafei, que foi minha companheira e me acompanhou nessa trajetória;

A DEUS que me deu o Dom da vida para que hoje eu estivesse aqui.

**"Dedico aos meus pais e a minha
irmã que acreditaram em mim e
me proporcionaram esta
oportunidade. Eu amo vocês,
OBRIGADA!!!"**

**"a medicina e a microbiologia
devem trabalhar juntas, caso
contrário, uma vez mais, todo o
mundo se tornará anaeróbio".
(MEDEIROS 1972)**

RESUMO

ANDRADE, K. A **Comparação do perfil eletroforético (esterase) de cepas de *Clostridium perfringens* de origem bovina e aviária.** [Dissertação de Mestrado - Faculdade Saúde Pública - Universidade de São Paulo].

Foram isoladas 22 cepas de *Clostridium perfringens*, de amostras de origem bovina e aviária. Todas as cepas foram analisadas por provas bioquímicas para identificação da espécie. Para a tipificação, primeiramente foi realizada análise eletroforética corada para esterase das cepas padrão ATCC dos tipos A, B, C e D. Os géis foram analisados de acordo com a mobilidade eletroforética e atividade enzimática, observando-se bandas específicas para cada tipo de *C. perfringens*. Todas as cepas isoladas foram analisadas por eletroforese e comparadas com os padrões. Em relação ao total de cepas isoladas (22), 11 foram provenientes de aves, sendo que, (1) 4,54% foi do tipo A e (10) 45,6% do tipo C, e 11 provenientes de bovinos, sendo que, (5) 22,72% foram do tipo A, (2) 9,09% B e D, enquanto que (1) 4,55% do tipo C. Uma amostra de bovino ficou indeterminada apresentando bandas tanto de C quanto de D. Os resultados permitiram demonstrar a possibilidade da utilização da eletroforese corada para esterase para estudos epidemiológicos por ser um método adequado e de fácil realização. Os resultados também revelaram o perigo gerado para a Saúde Pública, levando em consideração que os tipos A e C estão relacionados com patogenias em humanos e os órgãos em que foi isolada a maior porcentagem desses tipos serem destinados ao consumo humano.

SUMMARY

ANDRADE, K. A **Comparison of the esterase electrophoresis of *Clostridium perfringens* strains from bovine and avian origin.** [Master dissertation - Faculty of the Public Health - University of São Paulo- Brazil].

Twenty two strains of *Clostridium perfringens* were isolated from bovine and avian samples. All the strains were analyzed by biochemical tests for species identification. Classification into types was done by esterase electrophoresis with isolated strains and pattern ATCC types A, B, C and D. The gels were analyzed using mobility electrophoresis and enzymatic activity and compared with the pattern ones, as each type showed a different zone. From a total number of strains (22), 11 were of avian origin, and (1) 4.54% were classified as type A and (10) 45.6% as type C. Among strains isolated from bovine samples (11), (5) 22.72% were identified type A, (2) 9.09% as B and D and (1) 4.55% as C. One of the bovine strains showed zones as type C and D. Those results indicated that esterase electrophoresis is a suitable and easy to perform method to be applied in epidemiologic studies of *Clostridium perfringens* strains. Data obtained pointed out to the Public Health risk that can be originated if bovine and avian meat are destined to human consumption without inspection as types A and C were isolated from those samples.

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Toxinas principais	4
1.1.1. Toxina alfa	4
1.1.2. Toxina beta	6
1.1.3. Toxina épsilon	6
1.1.4. Toxina iota	7
1.2. Tipos de <i>C.perfringens</i>	8
1.2.1. <i>C.perfringens</i> tipo A	8
1.2.2. <i>C.perfringens</i> tipo B	9
1.2.3. <i>C.perfringens</i> tipo C	9
1.2.4. <i>C.perfringens</i> tipo D	10
1.2.5. <i>C.perfringens</i> tipo E	10
1.3. Caracterização do <i>C. perfringens</i>	11
1.3.1. Doenças causadas pelo <i>C. perfringens</i>	12
1.4. Métodos de tipificação para <i>C. perfringens</i>	12
1.5. Histórico em amostras de humano e alimentos	16
1.6. Histórico em amostra de aves	19
1.7. Histórico em amostras de bovinos	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivo Específico	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Isolamento e caracterização bioquímica das cepas	29

4.2. Cultivo das cepas, padrão e de teste, para realização da eletroforese	30
4.3. Estimativa da concentração de proteína	31
4.4. Caracterização e análise dos perfis eletroforéticos de esterase nos extratos bacetrianos	31
5. RESULTADOS	33
5.1. Caracterização bioquímica das cepas	33
5.2. Tipificação eletroforética (esterase)	33
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	I

1. INTRODUÇÃO

Em humanos as bactérias anaeróbias estão naturalmente distribuídas pela pele, mucosas, trato gastrointestinal, uretra e vagina, cuja relação anaeróbios – aeróbios está estabelecida em 10:1 na vagina, cavidade oral e pele e 1.000:1 no intestino grosso (FINEGOLD 1995).

A maioria das infecções anaeróbias humanas é causada por bactérias de origem endógena da flora normal que encontram nos tecidos, fora do seu habitat natural, condições para sua multiplicação e produção de toxinas (BALOWS 1975).

Os animais domésticos, mesmo aqueles que recebem tratamento adequado, estão em constante contato com o solo e suas próprias fezes, que contém inúmeros microrganismos, incluindo-se os anaeróbios, constituindo uma importante fonte exógena de contágio para o homem, sofrem porém, mais infecções por estes agentes do que o homem, causando grandes perdas econômicas para criadores (STERNE e BATTY 1975).

As infecções anaeróbias podem envolver as mais diversas áreas do organismo, porém são mais comumente encontradas em órgãos como fígado, rim, cérebro entre outros, ou causando bacteriemia, otites crônicas, infecções dentais e orais, endocardites, endometrites, meningites, mionecroses, artrites e sinusites, determinadas sobretudo pelos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium* (STEPHEN e col. 1985; FINEGOLD 1995).

Dentre as espécies de *Clostridium* spp as de maior importância para humanos nas infecções anaeróbias são *Clostridium botulinum* (tipo A, B, C e D), *C. perfringens* (tipo A e C), *C. difficile* e *C. tetani*, enquanto que para os animais estão *C. botulinum* (tipo A, B, C e D), *C. perfringens* (tipo A, B, C e D), *C. tetani* e *C. chauvoei* (STEPHEN e col. 1985).

Atribui-se a ACHALME (1891) a primeira descrição do *C. perfringens*, o qual relatou de um caso de reumatismo articular agudo a presença de um bastonete gram-positivo anaeróbio, produtor de esporos em culturas velhas, semelhante ao *Bacillus anthracis*.

Desde então cerca de oito denominações lhe foram conferidas (SIMONDS 1915): *Bacillus aerogenes capsulatus* (WELCH e NUTTALL 1892); *C. welchii* (MIGULA 1900 apud CATO e col. 1986); *Bacillus agni* (DALLING 1928 apud WILSDON 1931); *Bacillus paludis* (McEWEN 1930); *Bacillus ovitoxicus* (BENNETTS 1932); *Bacillus perfringens* (HAUDUROY e col. 1937 apud CATO e col. 1986); e *C. perfringens* (SMITH e HOBBS 1974).

A classificação foi inicialmente feita com base nas características bioquímicas. SIMONDS (1915) foi um dos primeiros a agrupar o *C. perfringens* em quatro subgrupos. Esta classificação foi aceita por alguns (HALL 1922; HOWARD 1928), criticada por outros (HUMPHREYS 1924), porém é mantida até o presente momento.

Além da caracterização bioquímica foram realizados diversos testes de aglutinação (WARRACK 1963) e neutralização da toxina (BULL e PRITCHETT 1917), porém o teste aceito pelo *Medical Research Council* (MRC) é a neutralização, *in vivo*, e *in vitro*, da toxina pela antitoxina (MacLENNAN 1962).

Em 1931 WILSDON verificou que além dos estudos bioquímicos e morfológicos a reação obtida entre toxina e antitoxina era importante para a classificação e então em 1932 e 1933 ele classificou o *C. perfringens* em quatro tipos sorológicos A, B, C e D (McDONEL 1980), porém em 1949 ROSS, WARREN e BARNES incluíram à classificação de WILSDON (1932-33) cepas isoladas por BOSWORTH em 1943 e identificadas por ele como sendo tipo E.

A classificação feita por WILSDON (1932-33), foi determinada com base na produção de antígenos ditos *major* ou principais (Quadro 1), que por sugestão de GLENNY e col. (1933) foram designados por letras gregas: alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) e iota (ι) (STERNE e WARRACK 1964). Atualmente, continuam sendo reconhecidos cinco tipos de *C. perfringens*.

Quadro 1. Classificação de *C. perfringens* em tipos, segundo a produção de antígenos principais (SMITH e HOBBS 1974).

Tipos de <i>C. perfringens</i>	Antígenos Principais			
	alfa (α)	Beta (β)	épsilon (ϵ)	iota (ι)
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++ produtor, fração tóxica predominante

+ produtor, em menor quantidade

- não produtor

OAKLEY e WARRACK (1953), BROOKS e col. (1957), STERNE e WARRACK (1964) e HAUSCHILD (1971) realizaram estudos em que observaram a existência de antígenos solúveis ditos *minor* que não afetam diretamente na determinação dos tipos, mas sim na identificação dos subtipos, sendo também fundamentais para os levantamentos epidemiológicos, e foram denominados: delta (δ), teta (θ), capa (κ), lambda (λ), mi (μ), ni (ν), eta (η) gama (γ), neuraminidase e a enterotoxina (Quadro 2).

Quadro 2. Toxinas produzidas pelos cinco tipos de *C. perfringens* (McDONEL 1980)

Tipos de <i>C. perfringens</i>	Toxinas produzidas													
	<i>Major</i>				<i>minor</i>								Outras	
	α	β	ϵ	ι	δ	θ	κ	λ	μ	ν	η	γ	En	nm
A	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	\pm	-	+	+
B	+	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	-	\pm	.	+
C	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	\pm	+	+
D	+	-	(+)	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
E	+	-	-	(+)	-	+	+	+	-	+	-	-	.	+

+ produzido por alguns tipos

- não conhecida a produção

(+) protoxina, requer ativação por enzimas

\pm existência questionada

. não estudada

en enterotoxina

nm neuraminidase

1.1. Toxinas principais

1.1.1. Toxina alfa (α)

A toxina α apresenta atividade citolítica, hemolítica, dermonecrótica, e letal, sendo a primeira para qual demonstrou-se sua atividade enzimática (GLENNY e col. 1933; SMITH 1979). Sua produção pode ser obtida em poucas horas de cultivo em meio contendo peptona e carne (DALLING e ROSS 1938). Seu peso molecular está estimado entre 30 e 106 kDa, sendo codificada pelo gene estrutural *cpa* localizado

na região variável do cromossomo do *C. perfringens* (McDONEL 1980; ROOD 1998; PETIT e col. 1999). É uma fosfolipase C, cálcio dependente que hidrolisa fosfolípidios promovendo a desorganização da membrana celular (SWARTZ 1990; PETIT e col. 1999). *In vitro*, sua presença pode ser verificada por hemólise determinada em meios contendo hemácias e pela precipitação da lecitina observada em meios contendo gema de ovo (OAKLEY 1943; OAKLEY e WARRACK 1953; WILLIS 1969; SMITH 1975). *In vivo*, a hidrólise da lecitina produz diacilglicerol, que induz a síntese e liberação de mediadores inflamatórios, provocando contração dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e disfunção miocárdica, que contribuem para o estabelecimento de choque profundo e morte (PETIT e col. 1999). Como a lecitina está presente na membrana da maioria das células, causa extenso dano aos vários tecidos (SMITH 1979; SWARTZ 1990). Hidroliza cefalina e esfingomiéline, sendo considerada como o fator de virulência mais importante na determinação da gangrena gasosa (SWARTZ 1990; ROOD e COLE 1991).

Experimentalmente, seus efeitos podem ser evidenciados empregando-se diversas vias de inoculação: letalidade, endovenosa (GLENNY e col. 1933; OAKLEY e WARRACK 1953) e intraperitoneal (DOWELL e HAWKINS 1974; SMITH 1975) em camundongos e dermonecrose por via intradérmica em cobaias (OAKLEY e WARRACK 1953; SMITH 1975).

1.1.2. Toxina beta (β)

De acordo com SMITH (1975) a obtenção desta toxina *in vitro* atinge o seu título máximo com 4 a 5 horas de incubação a 37°C em meio contendo pedaços de carne. É termolábil, a 50°C por 5 minutos perde 75% de sua atividade (DOWELL e HAWKINS 1974; SMITH 1975), pode ser inativada pela ação da tripsina a 37°C por 30 minutos pois é mais sensível a ação de enzimas proteolíticas, e a outros fatores ambientais do que as demais (NILO 1980).

Atualmente está subdividida em β_1 e β_2 , que foi encontrada em uma cepa porcina do *C. perfringens* tipo C isolada por PETIT e col. (1999). Ambas são citolíticas, dermonecroticas e letais, porém a β_2 demonstra 15% de identidade de seqüência e um reduzido nível de reação imunológica cruzada com a toxina β_1 . São codificadas, respectivamente, pelos genes estruturais *cpb1* e *cpb2*, localizados em um grande plasmídeo do *C. perfringens* (ROOD 1998). Provocam necrose hemorrágica da mucosa intestinal e embora sejam citotóxicas, seus mecanismos de ação ainda não estão elucidados.

1.1.3. Toxina épsilon (ϵ)

A toxina ϵ é uma proteína com peso molecular estimado entre 23.2 e 43 kDa (McDONEL 1980). Apresenta ação dermonecrotica e letal, produzindo edema no fígado, rins e sistema nervoso central. É codificada pelo gene estrutural *etx*, localizado em um grande plasmídeo (ROOD 1998; PETIT e col. 1999), sua produção ocorre durante a multiplicação do microrganismo no intestino, sendo eliminada como uma protoxina inativa que, após ação de proteases clostridiais e da tripsina intestinal,

perde um peptídeo N-terminal e é convertida em sua forma ativa (SWARTZ 1990; HUNTER e col. 1992). Sua produção máxima, *in vitro*, ocorre, segundo GLENNY e col. (1933), entre 3 e 5 dias de incubação a 37°C e, de acordo com PIVNICK e col. (1965), com 5 a 7 horas nesta mesma temperatura. A ação dessa toxina pode ser demonstrada após tripsinização, uma vez que ela se apresenta na forma inativa (OAKLEY e WARRACK 1953), por lesões características em inoculações por via intradérmica em cobaias (WARRACK 1963).

1.1.4. Toxina iota (ι)

A toxina ι é produzida na forma de protoxina necessitando, portanto, ser ativada pela ação de proteases ou da tripsina intestinal. Sua presença foi determinada em cultivos de *C. perfringens* tipo E (CRAIG e MILES 1961), após 4 horas a 37°C. É uma toxina binária com atividade dermonecrotica e letal. Consiste de duas cadeias independentes de polipeptídeos: a proteína Ia que apresenta peso molecular de 47.5 kDa e age como um componente enzimático; e a proteína Ib com peso molecular de 71.5 kDa que atua como componente de ligação entre elas (PERELLE e col. 1993). As proteínas Ia e Ib são codificadas, respectivamente, pelos genes *iap* e *ibp*, ambos localizados em plasmídios (ROOD 1998; PETIT e col. 1999). A cadeia pesada Ib reconhece o receptor na superfície celular, sendo necessária para a penetração do componente Ia no citosol. A cadeia leve Ia cataliza a ribosilação de ADP dos monômeros de actina provocando despolimerização desses filamentos e a inibição das funções celulares que são dependentes do citoesqueleto de actina (PERELLE e col. 1993; PETIT e col. 1999). Segundo OAKLEY e WARRACK (1953), ela pode

ser observada pela letalidade, utilizando inoculação via endovenosa em camundongos e dermonecrose por via intradérmica em cobaias.

1.2. Tipos de *C. perfringens*

1.2.1. *C. perfringens* tipo A

O tipo A está presente no solo e no trato digestivo dos animais, principalmente em carneiros (GKIOURTZIDIS e col. 2001). É o mais comum dos tipos e o mais variável em relação às propriedades toxigênicas. De acordo com a produção de toxinas, pode ser subdividido em duas variedades: clássica e enterotoxigênica. A variedade clássica produz exclusivamente a toxina- α (WILSDON 1931, 1932-33) e está associada à gangrena gasosa em humanos, infecções traumáticas, mastite gangrenosa e enterite necrótica em aves (STERNE e BATTY 1975; NILO 1980; WALKER 1990; PETIT e col. 1999), enquanto a enterotoxigênica produz, além da toxina α , a enterotoxina, que determina enterite e intoxicação alimentar em humanos, diarreia em potros e suínos e toxinfecção em cães (CARVALHO e col. 1976; NILO 1980; PETIT e col. 1999).

Acredita-se que o *C. perfringens* tipo A esteja associado à enterotoxemia em ovinos e bezerros, mas seu papel nessa patologia é controverso visto que o mesmo faz parte da microbiota normal dessas espécies e seu isolamento não é uma evidência conclusiva de que ele seja o causador da doença, podendo ser facilmente isolado de tecidos e do trato intestinal do cadáver dentro de poucas horas após a morte (STERNE e BATTY 1975).

Algumas variedades são termorresistentes e possuem capacidade de se multiplicar rapidamente nos alimentos cozidos, uma vez que com o calor seus competidores aeróbios são eliminados (HOBBS e col. 1953).

1.2.2. *C. perfringens* tipo B

O *C. perfringens* tipo B produz as toxinas α , β e ϵ (WILSDON 1931, 1932-33). Causa enterite necrótica e enterotoxemia hemorrágica fatal em cordeiros (GAIGER e DALLING 1923; MASSON e col. 1931), diarreia em potros e carneiros (STERNE e BATTY 1975). No Oriente Médio uma variedade produtora de toxinas β e ϵ foi causa de enterotoxemia em caprinos e ovinos adultos (BROOKS e ENTESSAR 1957; STERNE e BATTY 1975). Estudos apresentam a prevalência deste tipo em 3,4% de amostras de origem bovina (BALDASSI 1998) e 46% em fezes diarreicas de ovinos (GKIOURTZIDIS e col. 2001).

1.2.3. *C. perfringens* tipo C

Foi isolado por McEWEN (1930), produz as toxinas α e β (WILSDON 1931, 1932-33; WALKER 1990), sendo responsável por casos de enterite necrótica em seres humanos, bovinos, equinos, ovinos e suínos (STERNE e BATTY, 1975; BUOGO e col. 1995) e diarreia sanguinolenta em 20% de carneiros estudados por GKIOURTZIDIS e col. (2001). Provoca enterite hemorrágica aguda e fatal em cordeiros e bezerros neonatos, a prevalência em animais muito jovens se deve ao fato de seu sistema digestivo apresentar um menor conteúdo enzimático, o que impede a inativação da toxina- β (GRINER e JOHNSON 1954). Pode ser isolado de casos entéricos não fatais de bezerros e de vacas adultas saudáveis (NILO 1980). No

Brasil estudos feitos por BALDASSI (1998) em bovinos revelaram 20,2% das amostras como desse tipo.

Em humanos foi isolado na Alemanha por ZEISSLER e RASSFELD-STERNBERG (1949) e na Nova Guiné por MURREL e ROTH (1963) outras variedades desse tipo produtoras de enterotoxina que causaram enterite necrótica.

1.2.4. *C. perfringens* tipo D

O *C. perfringens* tipo D produz as toxinas α e ϵ (WILSDON 1931, 1932-33). Provoca enterotoxemia, em caprinos, ovinos e potros (STERNE e BATTY 1975; WALKER 1990). Foi encontrado em 28% das fezes de carneiros estudadas na Grécia (GKIOURTZIDIS e col. 2001).

Em humanos foram descritos casos de infecções não fatais (KOHN e WARRACK 1955), embora em intoxicações mais graves possa atingir o sistema nervoso (STERNE e BATTY 1975). Parece ter uma distribuição mundial, mas normalmente não faz parte da microbiota normal do intestino, podendo ser isolado de material bovino *post-mortem*, porém a enterotoxemia aguda é rara nessa espécie (NILO 1980), embora BALDASSI (1998) tenha observado este tipo em 22,5% das amostras oriundas de bovino.

1.2.5. *C. perfringens* tipo E

O *C. perfringens* tipo E produz as toxinas α e ι (WILSDON 1931, 1932-33). Está envolvido em enterotoxemias de bezerros e cordeiros (BILLINGTON e col. 1998).

Esse microrganismo não era isolado com frequência de animais até que um surto de enterite em coelhos nos EUA forneceu evidências convincentes da sua patogenicidade. A doença caracterizou-se por diarreia profusa e morte em um período de seis horas. Sugeriu-se que fatores dietéticos fossem predisponentes para a participação do *C. perfringens* tipo E nesse surto (NILO 1980).

1.3. Caracterização do *C. perfringens*.

C. perfringens se caracterizam como bacilos curtos, imóveis, gram-positivos, retos medindo entre 0,9- 1,3 por 3,0- 9,0µm com extremidades arredondadas e cápsula bem definida (BEER 1988). À exceção dos demais *Clostridium* spp patogênicos raramente formam esporos nos tecidos e meios usuais de laboratório (SWARTZ 1990). Em ágar sangue formam colônias circulares, planas, amarelo-acinzentadas com aproximadamente 2 a 5 mm de diâmetro, superfície brilhante e circundadas por dupla zona de hemólise. Apresentam uma taxa de multiplicação acelerada (ROOD 1998).

Segundo SMITH e HOBBS (1974) são anaeróbios, não redutores do sulfato, hidrolisam a gelatina, fermentam carboidratos e tempestuosamente o leite devido a grande formação de gás (BEER 1988; WALKER 1990).

O *C. perfringens* está disseminado no solo e na matéria orgânica em decomposição. É um habitante normal do trato gastrointestinal dos seres humanos e

dos animais e está presente na superfície da pele, utensílios e nas peças de vestuário contaminadas pelos esporos presentes no solo (SWARTZ 1990; ROOD 1998).

1.3.1. Doenças causadas pelo *C. perfringens*

Enterites agudas ou enterotoxemias fatais foram relatadas envolvendo várias espécies animais, como ovinos (ROSE e EDGAR 1936), suínos (ESTRADA e col. 1989), caprinos (SCANLAN e EDWARDS 1990) e bovinos (MacKAY e col. 1971; MANTECA e col. 2001; MANTECA e col. 2002), assim como a morte súbita dessas mesmas espécies tem sido atribuída ao *C. perfringens* (NILO e AVERY 1963; STERNE e BATTY 1975; BALDASSI e col. 1995b). Nos animais domésticos o *C. perfringens* causa enterotoxemia e enterite necrótica (BLOOD e HENDERSON 1978; ROOD 1998). Na literatura nacional existem apenas dois relatos relacionados a cães (BALDASSI 1986; PIMENTA e col. 1989), enquanto que na literatura internacional há quatro relatos de casos (PRESCOTT 1978 apud BALDASSI 1986; COIGNOUL e DEWAELE 1979; BERG e col. 1979; CARMAN e LEVIS 1983). BERG e col. (1979) também relatam em seu trabalho caso em gato. BACCIARINI e col. (2001) descreveram um caso em elefante africano com diarreia e lesões na mucosa intestinal determinada por uma cepa de *C. perfringens* produtora de toxinas β_2 e α identificadas pela técnica da PCR.

1.4. Métodos de tipificação para *C. perfringens*.

A tipificação do *C. perfringens* em quatro tipos foi estabelecida por testes com base na produção de antígenos principais por WILSDON (1931) e reafirmada por ele mesmo em 1932, sendo um método importante (STERNE e WARRACK 1964).

Estes antígenos apresentam características como letalidade e dermonecrose que podem ser evidenciadas quando os filtrados de cultura são inoculados, respectivamente, por via endovenosa em camundongos e intradérmica em cobaias (OAKLEY e WARRACK 1953).

Para a tipificação o teste aceito tem sido o de soroneutralização em camundongos por via intraperitoneal, porém são necessários os animais e os vários anti-soros tipo-específicos (DOWEL e HAWKINS 1974).

Outros estudos foram realizados com o objetivo de delinear testes, *in vitro*, para eliminar o uso de animais de laboratório e anti-soros tipo-específicos (ORR e REED 1940; HENDERSON 1940; WARRACK 1963; BUOGO e col. 1995; UZAL e col. 1996; UZAL e col. 1997; WARREN e col. 1999), pois o fato de ocorrerem variantes não toxigênicas ou que perderam sua capacidade de produzir toxinas (DALLING e ROSS 1938; BUDDLE 1954) associados aos diferentes tipos de *C. perfringens* tornam este teste inapropriado para a rotina.

Foi ainda testada a tipificação por bacteriocinas que se constitui em um método simples e eficiente (MAHONY 1974; MAHONY 1979; SATIJA e NARAYAN 1980). SCOTT e MAHONY (1982) recomendam o uso de bacteriocinas para amostras não sorotipáveis e para amostras de origem alimentar, obtendo 100% de eficiência na tipificação (STRINGER e col. 1982). Porém a desvantagem dessa metodologia está ligada a quantidade de tipos, que varia de acordo com a época,

podendo vários estarem presentes simultaneamente, havendo portanto a necessidade de se estudar diversas colônias.

Métodos *in vitro*, como gel difusão em coluna (OAKLEY e FULTHORPE 1953; ORLANS e JONES 1958) e hemaglutinação foram tentados e abandonados por não apresentarem resultados satisfatórios (WARRACK 1963).

Alguns testes como de imunodifusão (ELLNER e BOHAN 1962), gel de difusão simples, contraímunoeletroforese (GIUGLIANO e col. 1983; HOLLIDAY 1985), ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) (BARTHOLOMEW e STRINGER 1983) e teste de atividade citotóxica em célula VERO (McCLANE e McDONEL 1979; McDONEL e McCLANE 1979), têm a vantagem de não usarem modelos animais e apresentarem alta sensibilidade, porém não possuem a aplicação dos ensaios biológicos.

A eletroforese em gel de acrilamida foi desenvolvida independentemente por RAYMOND e WEINTRAU (1964); ORNSTEIN e DAVIS (1964); STEGEMANN e col. (1969).

LAEMMLI (1970), descreveu originalmente a eletroforese em SDS gel para microrganismos e desde então essa técnica se intensificou. MILKMAN (1973) foi quem iniciou os estudos em bacteriologia utilizando como microrganismo de estudo a *Escherichia coli* (SELANDER e LEVIN 1980; OCHMAN e col. 1983; WHITTAN e col. 1983) e esta técnica já abrange bacilos gram-negativos, outras enterobactérias,

não fermentadores e mesmo os anaeróbios (STROM e col. 1976; SWINDLEHURST e col. 1977; POXTON e BROWN 1979; BORIES e col. 1993 apud CHETOUI e col. 1995).

GILLESPIE e LANGLEY (1974) demonstraram através da análise eletroforética que em populações de organismos diplóides as esterases hidrolizam múltiplos substratos e geralmente são mais variáveis do que as enzimas que utilizam um único substrato, em contra partida GOULLET e PICARD (1984) observaram para os organismos haplóides condições de diferenciação específica e subespecífica baseadas na diversidade eletroforética apresentada pelas esterases.

Em estudos taxonômicos, epidemiológicos e para genética de populações a análise eletroforética de enzimas bacterianas tem apresentado bons resultados, pois a distinção de bactérias de uma mesma espécie pode ser feita com base no tipo de esterase definida pela especificidade do substrato e motilidade (PICARD e GOULLET 1987; GOULLET e PICARD 1995).

Segundo PONS e col. (1993) é uma técnica que permite ser estendida a qualquer bactéria, pois os reagentes utilizados podem ser os mesmos e dispensa o uso de anti-soros, bacteriocinas e antitoxinas que nem sempre estão disponíveis, tornando-se um método bastante eficiente.

1.5. Histórico em amostras de humanos e alimentos

Em humanos o *C. perfringens* causa gangrena gasosa e dois tipos diferentes de intoxicação alimentar, associadas ao tipo A (McDONEL 1980). As gangrenas gasosas são casos raros na literatura e sempre vinculados a traumatismos e pós-cirurgia (SAXENA e col.1999), enquanto que endometrite posterior ao parto é uma complicação comumente observada (HALPIN e MOLINARI 2002), além de um caso relatado de carcinoma de ceco (IGOE e TRUANT 2002).

Os *C. perfringens* tipo A produtores de enterotoxina são importante causa de intoxicação alimentar e doença gastrointestinal não associada ao consumo de alimentos, incluindo-se diarreias associadas a antibióticos (MEYER e THOLOZAN 1999; SPARKS e col. 2001).

Os casos de intoxicação alimentar apresentam, em geral, produtos cárneos como fonte de infecção. As formas vegetativas ingeridas com o alimento, determinam a produção de enterotoxina quando, no intestino delgado, passam à forma esporulada. Quantidades da ordem de 10^6 UFC/g são suficientes para determinar o quadro clínico da intoxicação (BORRIELLO e col. 1984; LARSON e BORRIELLO 1988).

No período de 1970/1980 foram registrados 567 surtos de toxinfecção alimentar na Inglaterra (HATHEWAY 1990) e 190 no período de 1973/1987 nos EUA (BEAN e GRIFFIN 1990). Em 1991, no Canadá e na Inglaterra, o *C. perfringens* representava, a segunda causa entre as Doenças de Origem Alimentar (DOA) passando para o terceiro posto nos EUA (LABBÉ 1991). O *C. perfringens* tipo A e o *C.*

haemolyticum estão associados a surto de “jisizheng” na China, cuja morte é precedida por extensas hemorragias em vísceras e trato digestivo (CHANGQING e XUELI 2001).

Cepas do tipo C determinam enterite necrótica rara, porém fatal, de ocorrência eventual na África, Ásia e Sul do Pacífico, atingindo crianças com acentuada desnutrição protéica e pacientes diabéticos. A enfermidade é atribuída à toxina β_1 (McDONEL 1980; GUI e col. 2002).

Carcças de aves de plantéis de poedeiras apresentaram, em estudos feitos por CRAVEN e col. (2001), entre 8-68% de contaminação por *C. perfringens*. Na Korea estudos realizados em carcaças de suínos revelaram uma contaminação de 10^6 UFC/g (RHO e col. 2001).

Em países do Reino Unido um levantamento sobre surtos de infecção intestinal, ocorridos no período de 1992-1999, relacionados à carne de frango determinaram, para *C. perfringens*, a segunda posição, com 21% dos casos. Os surtos envolveram 7.000 pessoas com 258 hospitalizações e 17 mortes (KESSEL e col. 2001). Na Finlândia no período de 1975-1999 foram registrados 238 casos relacionados a alimentos contaminados. Foram estudadas por PCR, quarenta e sete cepas isoladas, no período de 1984-1999, das fezes de pacientes com suspeita de toxinfecção alimentar, que determinou a presença do gene que codifica a enterotoxina do *C. perfringens* na maioria delas (LUKINMAA e col. 2002).

Outro levantamento realizado nos EUA no período de 1982-1989, inclui, 712 surtos de DOA; síndrome diarréica associada a toxina de *C. perfringens*, entre outras 4 síndromes, contabilizando 624 (87,6%) dos casos (HALL e col. 2001). GUTIÉRREZ e col. (1999) relatam que de 27 estabelecimentos públicos de alimentação na Costa Rica, foram coletadas 81 amostras de carne das quais 37 (46%) foram positivas para *C. perfringens*. Destas 37 verificou-se que 12 (32%) eram produtoras de enterotoxina.

Outras patologias têm sido associadas ao *C. perfringens* como sinusite paranasal e tonsilite (ROSENBLUM e col. 2001; GERBER 2001). A China apresenta para casos de bacteriemia em pacientes com cirrose hepática o isolamento de *C. perfringens* em 77% deles (CHEN e col. 2001).

Plantas medicinais utilizadas em infusão apresentam elevada porcentagem de contaminação, constituindo-se em potenciais fontes de infecção para humanos (MARTINS e col. 2001).

No Brasil, a real frequência de casos de toxinfecções alimentares causadas por *C. perfringens* é desconhecida, embora se possa prever, para diversas cidades, uma alta incidência, determinada pelo clima tropical e falta de controle sanitário na manipulação e estocagem de alimentos (TÓRTORA e COSTA 1985).

SOUZA e TÓRTORA (1986), analisaram amostras de carne moída bovina e puderam observar que apenas 7,1% das amostras apresentaram contaminação por *C.*

perfringens enterotoxigênico. BRANDÃO em 1980 tipificou 308 cepas isoladas de fezes e solo na região do Rio de Janeiro, o que a levou a crer que a presença dessa bactéria no solo pode contribuir para a contaminação cruzada de alimentos.

Os resultados desses estudos revelaram uma elevada frequência desta bactéria em nosso ambiente o que se leva a pressupor sua participação nos casos de toxinfecções alimentares. Porém a inexistência de laboratórios especializados para o diagnóstico e a falta de procura médica pela maioria dos pacientes acometidos, faz com que somente alguns casos esporádicos sejam descritos entre nós (SALZBERG e col. 1982).

1.6. Histórico em amostras de aves.

O primeiro relato foi creditado a MORSE (1907) nos Estados Unidos (apud PECKHAN 1984) que alertava para os graves danos observados em codornas e galos silvestres, na Inglaterra. Outros relatos foram sendo registrados em outros países, acometendo codornas, pombos, galinhas, uru, tordo americano, perus e avestruzes (DURANT e DOLL 1941; PECKHAM 1959; WINTERFIELD e BERKHOFF 1977; GLOVER 1951; GARDNER 1967; NOBRE e col. 1973; CHALMERS 1990; DROUAL e col. 1995; URBANO e col. 2001).

BERKHOFF e col. (1973 a, b) em seus estudos sobre as enterites das aves, publicaram trabalhos nos quais discutem, com detalhes, a etiopatogenia desses processos entéricos e caracterizam a presença constante de um agente do gênero *Clostridium* nos casos de enterite ulcerativa, para o qual propuseram a denominação

de *Clostridium colinum*. Posteriormente BERKHOFF e CAMPBELL (1973) reproduziram experimentalmente a doença. Anos após, BERKHOFF (1975) estudou as características antigênicas desses agentes e os aspectos diferenciais entre a enterite necrótica e a ulcerativa, reforçando, dessa forma, a distinção entre as duas espécies, *C. perfringens* e *C. colinum*. Entretanto, a distinção laboratorial dessas duas espécies bacterianas é sutil e depende da realização de provas específicas como o uso de indicadores biológicos especiais para a caracterização deste último (DAVIS e col. 1971).

GOUGH e PETTIT (1975) consideraram que, na enterite ulcerativa, a simples presença do *C. colinum* é suficiente para o desencadeamento da doença, enquanto que, nos casos de enterite necrótica, há em geral, a necessidade da contribuição de outras causas como, por exemplo, a presença de parasitas intestinais.

Na enterite ulcerativa, tanto quanto na necrótica os casos mais graves podem estar freqüentemente associados com outras doenças como as parasitoses e ou coccidiose intestinal (KWATRA e CHAUDHURY 1976; DROUAL e col. 1995).

AL-SHEIKHLY e AL-SAIEG (1980) observaram a associação da enterite necrótica com a presença de *Eimeria acervulina* e *Eimeria necatrix*. BROUSSARD e col. (1986) trabalhando com poedeiras alojadas em gaiolas, destacaram o encontro de coccidiose associada à enterite necrótica pela observação da ampla distensão das alças intestinais motivada pela presença do gás resultante da doença. Ressaltam ainda a importância da associação entre antibióticos e coccidiostáticos no tratamento.

GAZDZINSKI e JULIAN (1992) observaram vários oocistos de *Eimeria* sp, em perus que apresentavam quadro de enterite necrótica. BALDASSI e col. (1995a) também fizeram a mesma observação em surto de enterite ocorrido em frangos de corte de uma importante região avícola do Estado de São Paulo. BILDFELL e col. (2001) encontraram em 4 dos oito pássaros com enterite necrótica submetidos à necropsia, a presença de parasitas acantocéfalos.

HELMBOLDT e BRYANT (1971), estudaram a patologia da enterite necrótica aviária e LONG (1973) realizou detalhada revisão da literatura sobre a doença em frangos de corte determinando a prevalência da mesma na região de Ontário. Em complementação aos seus estudos, LONG e col. (1974) publicaram, um ano após, trabalho no qual discutiram a patologia e a patogenia da enterite necrótica nesse tipo de ave.

Ainda devem ser lembrados os trabalhos experimentais com enterites aviárias devidas aos anaeróbios. PARISH (1961 a, b, c) provocou enterite necrótica em aves e COWEN e col. (1987); FUKATA e col. (1988); CRUZ e col. (1998) e HEIER e col. (2001) reproduziram enterite necrótica em frangos de corte e URBANO e col. (2001) em avestruzes para estudar seu controle através da antibioticoterapia. AL-SHEIKHLY (1977) fez estudos sobre a patogenia da enterite necrótica em galinhas, considerando-a como uma enterotoxemia grave e, a seguir, AL-SHEIKHLY e TRUSCOTT (1977 a, b) realizaram estudos das toxinas do *C. perfringens* introduzindo-as diretamente no duodeno de galinhas para observação das lesões; COWEN e col. (1987) igualmente obteve êxito no desenvolvimento da enterite

necrótica em galinhas. ITURRINO e col. (2001) reproduziram a enterite necrótica em frangos de corte para testar a eficácia de promotores de crescimento.

1.7. Histórico em amostras de bovinos.

Para animais NILO (1980) comenta sobre a ocorrência e importância da doença nas várias espécies suscetíveis mas enfatiza que faltam conhecimentos sobre a distribuição dos tipos e sua patogênese, diagnóstico e incidência. Ainda ressalta que mortes nos rebanhos constituem significativa proporção das perdas econômicas e muitos casos permanecem não diagnosticados porque há dificuldades relacionadas ao diagnóstico, bem como áreas onde o conhecimento é limitado. Aponta ainda como problemas o isolamento, detecção ou identificação das cepas das várias espécies, com frequência presentes no mesmo órgão ou carcaça; sucesso na determinação da patogenicidade e toxigenicidade em condições de laboratório e correta interpretação dos resultados, reconhecimento clínico da infecção baseada em sinais e achados de necropsia, histórico anterior e localização geográfica.

No Brasil, BALDASSI e col. (1988) trabalhando com amostras oriundas de bovinos com sintomatologia nervosa detectaram em 75 amostras 20% de positividade para a presença deste agente em cérebro e 9% em fígado.

MULLER e col. (1998), relataram um caso de clostridiose em bovinos em Aquidaban (Paraguai), causado pelo *C. perfringens* tipo D, que foi descrita como "Síndrome Paraplégica Bovina"(Mal de Aquidaban), pois os animais apresentavam paralisia nos quartos traseiros iniciando-se com tremores musculares 2 ou 3 dias após

terem sido vacinados contra esse agente. Estudos realizados por UZAL e col. (2002), puderam demonstrar, em bovinos, os efeitos da toxina ϵ do *C. perfringens* tipo D, caracterizando as manifestações neurológicas, lesões intestinais, pulmonares, dispnéia, hiperestesia, opstótono e convulsões. Tais resultados os levaram a acreditar que os bovinos são extremamente suscetíveis a toxina ϵ produzida pelo tipo D.

Em um estudo de caso-controle realizado para observação da associação do *C. perfringens* tipo A na formação de úlcera abomasal fatal em bezerras, foi observada a presença desse agente em 78,6% nos casos, enquanto que 75% no controle, o que evidencia que não há associação do *C. perfringens* com a formação da úlcera (JELINSKI e col. 1995).

LULOV e ANGELOV (1986) relataram 32 casos de enterotoxemia em bovinos recém-nascidos causada por *C. perfringens* tipos A, C e D, nos quais os casos envolvendo o tipo A apresentaram uma leve hemorragia e hemossiderose na superfície do fígado, rim e baço. O tipo C foi responsável pela enterite necrótica com diarreia sanguinolenta e degeneração de células e do cérebro, enquanto que o tipo D, causou severa distrofia nos rins.

STURION e col. (2001) relataram casos de mastite gangrenosa causada por *C. perfringens*.

DENNISON e col. (2002) observaram o comportamento desse agente em 22 casos de rebanhos de leite, descrevendo os sinais clínicos: profunda depressão, decréscimo

na produção de leite, distensão abdominal e fezes sanguinolentas. Dentre 20 amostras de fezes analisadas, *C. perfringens* foi isolado em 17 delas.

2. JUSTIFICATIVA

O *C. perfringens* está presente naturalmente no trato gastrointestinal do homem e animais e no solo e está associado a diversas doenças que envolvem tanto o homem quanto os animais.

Para os humanos os casos de intoxicações alimentares, têm como principal fonte de infecção os produtos cárneos, sejam eles de origem bovina, suína ou aviária. Porém para os animais a fonte de infecção pode ser a ração servida como alimento e o solo, onde se pode encontrar principalmente o *C. perfringens* tipo A.

Em relação a Saúde Pública, vale ressaltar que em outros países existe um maior número de publicações que relatam surtos ocorridos de intoxicações alimentares em humanos envolvendo este agente, enquanto que no Brasil a falta de pesquisa, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde e a não notificação por parte dos médicos, faz com que somente casos esporádicos sejam relatados.

Nos animais o diagnóstico é feito com base nos sintomas clínicos, achados de necropsia e confirmação laboratorial, porém somente do gênero e espécie, sem contudo caracterizar o tipo, o que seria um dado importante para estudos epidemiológicos tanto na área animal quanto na área de Saúde Pública.

Considerando-se esses aspectos, relativos a importância dessa doença tanto na saúde animal como na Saúde Pública, foi proposto este trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

3.1.1. Isolamento, identificação bioquímica e tipificação biomolecular de cepas de *C. perfringens* de origem aviária e bovina.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

3.2.1. Isolamento e identificação bioquímica de cepas de *C. perfringens* de origem aviária e bovina.

3.2.2. Tipificação das cepas de *C. perfringens* por eletroforese corada para esterase, em relação à padrões ATCC tipos A, B, C e D.

3.2.3. Comparação dos perfis eletroforéticos, corados para esterase, apresentados para as cepas caracterizadas como *C. perfringens*, selecionadas para o estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Materiais referentes a bovinos e aves, remetidos à Seção de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico- SP, com suspeita clínica de clostridiose foram processados para a tentativa de isolamento do gênero *Clostridium*. Dentre os isolados e identificados como *C. perfringens* foram selecionadas, ao acaso, 11 cepas de origem bovina: fígado (2); intestino (2); fezes (2); rim (2); canela (1); músculo (1); gânglio (1) e 11 de origem aviária, assim constituídas: fígado (5); intestino (3); coração (2); músculo (1). Os materiais de bovinos foram provenientes dos Estados de São Paulo (4), Santa Catarina (2), Paraná (1), Minas Gerais (1), Mato Grosso do Sul (2), Rondônia (1); enquanto que os de aves foram todos provenientes do Estado de São Paulo (Quadro 3).

Quadro 3. Relação das amostras isoladas segundo espécie e material clínico São Paulo/2002.

Amostra	Espécie	Material clínico
1	Bovina	Rim
2	Bovina	Rim
3	Bovina	Fígado
4	Bovina	Fezes
5	Bovina	Fezes
6	Bovina	Fígado
7	Bovina	Intestino
8	Bovina	Intestino
9	Bovina	Canela
10	Bovina	Músculo
11	Bovina	Ganglio
12	Ave	Músculo
13	Ave	Coração
14	Ave	Fígado
15	Ave	Intestino
16	Ave	Fígado
17	Ave	Fígado
18	Ave	Fígado
19	Ave	Intestino
20	Ave	Fígado
21	Ave	Intestino
22	Ave	Coração

4.1. Isolamento e caracterização bioquímica das cepas.

Um pequeno fragmento das amostras sólidas (fígado, rim, intestino e músculo) e/ou uma alíquota de 1 mL de fezes foram semeados em Meio de Carne Cozida (MCC), previamente aquecido em banho-maria por 10 minutos a 100°C, resfriado rapidamente (regeneração) e incubado sob atmosfera de anaerobiose, em jarra de McIntosh & Fields, a 37°C por 24/48 horas. Deste cultivo um volume de aproximadamente 1µL, correspondente a uma alça de níquel-cromo, era submetido à coloração de Gram para verificação da morfologia e tinção referentes ao gênero *Clostridium*. Um 1µL do cultivo das amostras sugestivas da presença do gênero, foi semeado em ágar sangue de carneiro a 5% e incubado sob atmosfera de anaerobiose, em jarra de McIntosh & Fields, a 37°C por 24/48 horas.

Após a incubação as colônias foram observadas com relação às suas características: aspecto, coloração, presença e tipo de hemólise. A morfologia bacteriana foi novamente verificada por esfregaços das colônias corados pelo método de Gram.

As culturas que apresentaram características semelhantes ao *C. perfringens* foram então submetidas a provas bioquímicas complementares. Aproximadamente 5 ou 6 colônias correspondentes a cada amostra foram semeadas em meio de PY (peptona e extrato de levedura) contendo, cada um deles: glicose, lactose, maltose e sacarose para fermentação de carboidratos e incubados por 24 horas sob atmosfera de anaerobiose como já descrito para identificação da espécie, além da presença de catalase, lecitinase e gelatinase. A interpretação destas provas foi feita segundo

HOLDEMAN e MOORE (1972).

As cepas, identificadas bioquimicamente como *C. perfringens*, foram repicadas para Meio de Carne Cozida (MCC) e após 18/24 horas de incubação a 37°C, o cultivo foi estocado a temperatura ambiente para a realização das demais provas.

4.2. Cultivo das cepas, padrão e de teste, para realização da eletroforese.

Foram empregadas como controle positivo quatro cepas de *C. perfringens* da *American Type Culture Collection* (ATCC) a saber: ATCC 3624 (tipo A), ATCC 3626 (tipo B), ATCC 3628 (tipo C) e ATCC 3629 (tipo D).

Uma alíquota de cada cepa (padrões e amostras) oriunda do meio MCC foi transferida para placa contendo ágar sangue de carneiro a 5% e incubada em jarra de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, 5 a 6 das colônias foram transferidas para tubo contendo 10 mL de caldo triptose e extrato de levedura (CTE), incubado nas mesmas condições descritas para placa. Os 10 mL deste mesmo cultivo foram transferidos para frasco com 90 mL do mesmo meio e incubado como já descrito.

Todas as etapas foram acompanhadas pela observação de esfregaços dos meios em lâminas, corados pelo método de Gram para constatação, à microscopia, da pureza dos cultivos.

O cultivo final foi então submetido à centrifugação por 15 minutos a 4°C em

7.500xg, para retirada do meio de cultivo. O sedimento obtido (massa celular) foi lavado com 10 mL de tampão tris-glicina 60 mM, pH 8,2, e submetido a 10.000xg por 10 minutos (PONS e col. 1993). A massa obtida foi suspensa em 1,0 mL do mesmo tampão, triturada com bastão de porcelana em presença de nitrogênio líquido e posteriormente centrifugada a 10.000xg a 4°C, por 30 minutos para remoção dos debris celulares (BACH 1991). O sedimento de todas as amostras foi aliquoteado e mantido a 20°C negativos até o momento da realização de dosagem de proteína e eletroforese corada para esterase.

4.3. Estimativa da concentração de proteínas

A concentração estimada de proteínas nos extratos bacterianos foi determinada pelo micro método do Ácido Bicinconínico (BCA) (SMITH e col. 1985; REDINBAUGH e TULEY 1986) utilizando-se albumina bovina tipo V como padrão (200µg-1mg). Para as amostras padrão e teste foram feitas diluições na base 2, em duplicata, colocando-se 10µl de cada diluição e 200µl da solução de BCA e Sulfato Cúprico (reagente), em placas para micro teste incubadas a 37°C por 30 minutos. As leituras foram obtidas em equipamento leitor de ELISA (*Microplate Reader* Modelo 3550-UV marca BIO-RAD) acoplado a computador com filtro de 540nm e programa específico (*Program Microplate Manager*).

4.4. Caracterização e análise dos perfis eletroforéticos de esterase nos extratos bacterianos

O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 7% (Acrilamida/Bisacrilamida) em tampão tris-glicina 0,1M, pH 8,2 (BACH 1991) e

colocado em placas molde. Todas as amostras (padrão e teste) foram colocadas nos poços na concentração em equivalentes de 600 µg de SAB/mL correspondente ao volume de 18 µl. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal e em presença do tampão tris-glicina 0,1M, pH 8,2 tendo como corante marcador de corrida o azul de bromofenol (0,25%). Em todos os géis a corrida foi realizada até 8cm à partir do poço com 10mA na fonte de eletroforese (BACH 1991), em sala refrigerada (aproximadamente 15°C).

Após a corrida o gel foi corado para enzima esterase como descrito em BACH (1991) usando o substrato α -naphthyl acetato, por um período de até 30 minutos. Logo após o gel foi lavado com água corrente e seco no secador de gel modelo 583 BIO-RAD entre folhas de celofane. O gel seco foi submetido à identificação e análise das bandas em densitômetro Bio Rad modelo GS-700 e programa *Molecular Analyst*.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização bioquímica das cepas.

Das 22 amostras, 11 cepas foram isoladas de bovinos e outras 11 cepas isoladas de aves entretanto, somente em 2 casos clínicos de aves foram isoladas 2 cepas de cada, sendo uma do fígado e outra do intestino.

No Quadro 4, pode-se observar, em relação às características bioquímicas, que todas as 22 amostras fermentaram a glicose, 13 a lactose, 11 a maltose e 13 a sacarose; entretanto, todas produziram hemólise e lecitinase além de hidrolisarem a gelatina e fermentarem também tempestuosamente o leite.

5.2. Tipificação eletroforética (esterase)

As análises eletroforéticas foram realizadas por densitômetro considerando-se a mobilidade eletroforética (R_m) e a atividade da esterase. A atividade da esterase corresponde a absorbância e respectiva área de cada banda. O Quadro 5 mostra a variação da R_m das cepas padrão, sendo que os padrões A, B e D apresentaram somente uma banda na corrida eletroforética medindo entre 2,8-3,9 cm para o A, 1,87-2,9 cm para o B e 2,5-3,65 cm para o D, enquanto que o padrão C apresentou duas bandas, uma entre 3,94-4,96 e a outra 4,98-5,50 cm medidos a partir do poço de aplicação. Os R_m encontrados foram categorizados por faixas e assim discriminados: F1 (1,87-2,9 cm); F2 (2,5-3,65 cm); F3 (2,8-3,9 cm); F4 (3,94-4,96 cm) e F5 (4,98-5,50 cm).

Na Figura 1, Quadro 5 e Gráfico 1, observou-se que ocorreu variação na

quantidade de enzima produzida pelos padrões (A, B, C e D), determinada através do cálculo da absorbância x área que foi igual à atividade da esterase.

Quadro 4. Caracterização bioquímica* das cepas isoladas de *C. perfringens*.

N. das cepas	Fermentação de Carboidratos				Produção de		Hidrólise da Gelatina	Fermentação Tempestuosa do Leite
	Gli	Lac	Mal	Sac	Lec	Hemol		
1	+	+	-	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	-	+	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	-	+	+	+	+
10	+	-	-	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	+	+	+	+	+
13	+	-	+	-	+	+	+	+
14	+	+	-	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+	+	+
17	+	+	+	-	+	+	+	+
18	+	+	+	-	+	+	+	+
19	+	+	-	-	+	+	+	+
20	+	-	-	+	+	+	+	+
21	+	+	+	-	+	+	+	+
22	+	+	-	+	+	+	+	+

Gli = Glicose

Lac= Lactose

Mal= Maltose

Sac= Sacarose

Lec= Lecitínase

Hemol= Hemólise

+ positivo

- negativo

* interpretação de acordo com HOOLDEMAN e MOORE (1972)

Quadro 5. Análise eletroforética das amostras padrão ATCC tipo (A, B, C e D) de *C. perfringens*, dada em função da mobilidade eletroforética (Rm) e Atividade esterase.

CEPAS PADRÃO	Rm				
	(F1) 1,87-2,9	(F2) 2,5-3,65	(F3) 2,8-3,9	(F4) 3,94-4,96	(F5) 4,98-5,50
A			18* 3,35**		
B	25,2* 2,38**				
C				15* 4,45**	13* 5,24**
D		30,8* 3,075**			

*Atividade esterase= Absorbância x área da banda da isoenzima

** Picos de cada padrão referentes a mobilidade eletroforética

F1, F2, F3, F4 e F5= Mobilidade eletroforética (Rm)

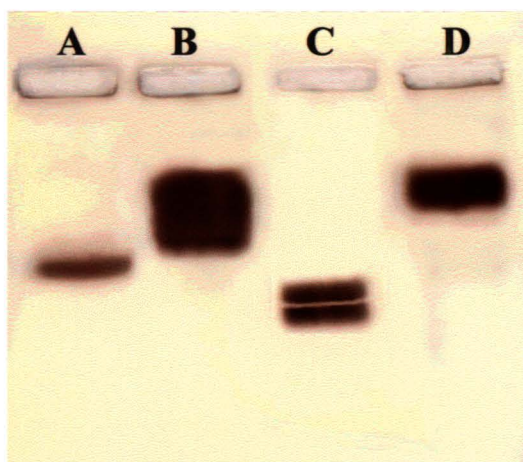


Figura 1: Eletroforese dos padrões (A, B, C e D) do *C. perfringens* corada para esterase.

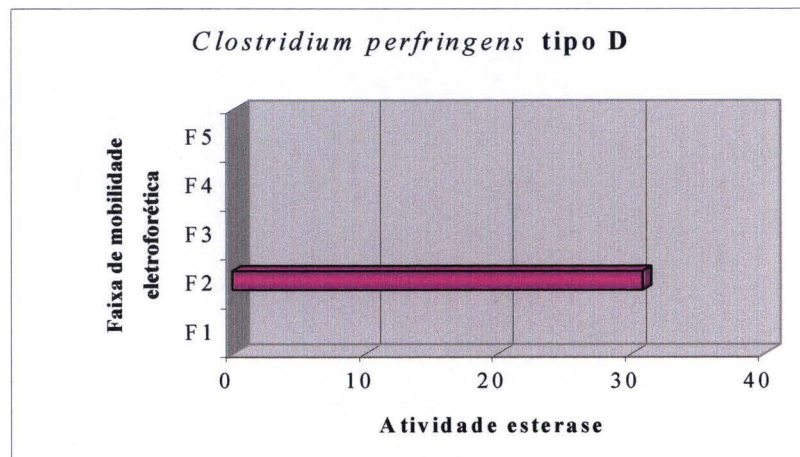
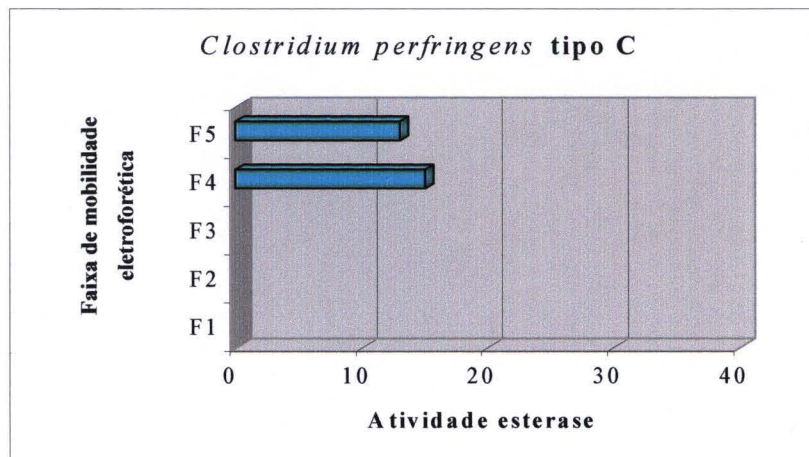
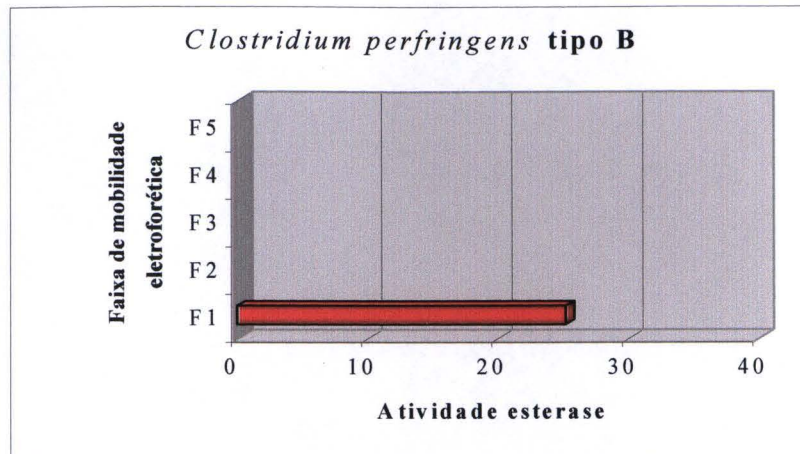
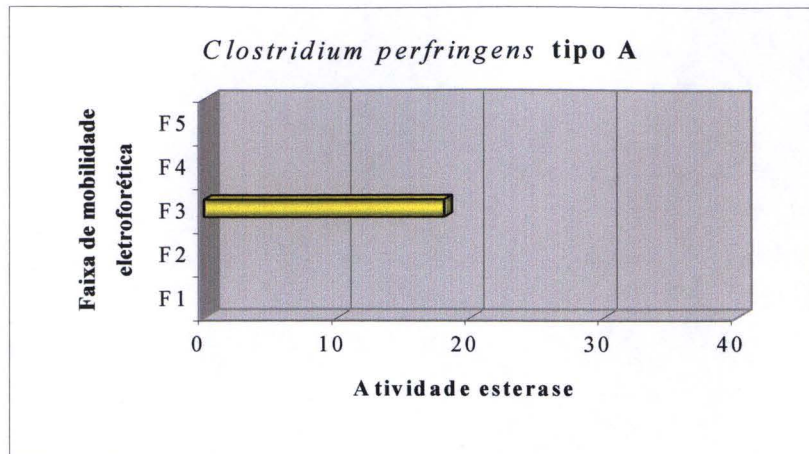


Gráfico 1. Densitometria das cepas padrão ATCC tipo (A, B, C e D) de *Clostridium perfringens* considerando-se a mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase. F1 (1,87-2,9 cm); F2 (2,5-3,65 cm); F3 (2,8-3,9 cm); F4 (3,94-4,96 cm); F5 (4,98-5,50 cm).

A análise densitométrica das amostras (Quadro 6) feita com o auxílio do computador confirmou a classificação prévia das cepas, nos diferentes tipos, pela observação das bandas. As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram a comparação de apenas algumas cepas selecionadas com seus respectivos tipos: A (1, 10, 16 e 5); B (11 e 7); C (3, 12 e 14) e D (8 e 9). Nos Gráficos 2, 3, 4 e 5 podem ser observados os picos de atividade enzimática para esterase produzida pelas amostras analisadas, respectivamente segundo o tipo de *C. perfringens*.

A Figura 6 e o Gráfico 6 revelam que dentre as 22 amostras analisadas, 1 amostra (6) apresentou 2 bandas distintas, onde uma poderia ser reconhecida como sendo tipo D e a outra como tipo C, podendo o dois tipos (C e D) estarem presentes na amostra por isso foi classificada como indeterminada.

Quadro 6. Análise eletroforética das cepas analisadas, dada em função da mobilidade eletroforética (Rm) x Atividade esterase.

AMOSTRAS CLÍNICAS	Rm				
	1,87-2,9 (F1)	2,5-3,65 (F2)	2,8-3,9 (F3)	3,94-4,96 (F4)	4,98-5,50 (F5)
1			29,2*		
2			15*		
3				3,7*	1,6*
4			9,2*		
5			9,2*		
6**		6,4*		31,6*	
7	8,8*				
8		19,9*			
9		49,1*			
10			10,5*		
11	11,9*				
12				5,3*	2,6*
13				8*	3,2*
14				7,8*	3,4*
15				32,1*	16*
16			31,7*		
17				3,2*	1,2*
18				19,9*	9,9*
19				19,3*	9,5*
20				9,8*	4,5*
21				8,9*	4,7*
22				16,7*	8,2*

*Atividade esterase= Absorbância x área da banda da isoenzima

** Amostra indeterminada

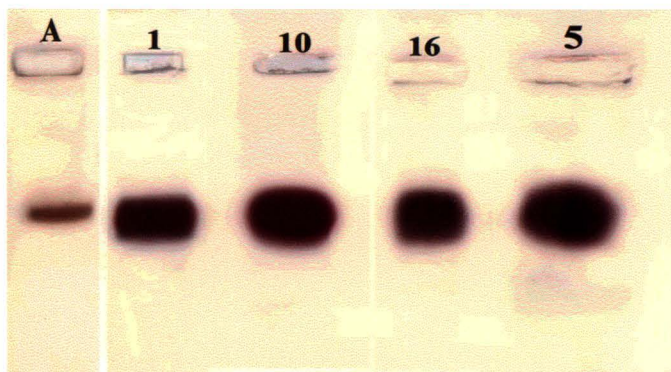


Figura 2: Eletroforese, do padrão (ATCC 3624) tipo A e amostras 1,10,16 e 5 de *C. perfringens*, corada para esterase.

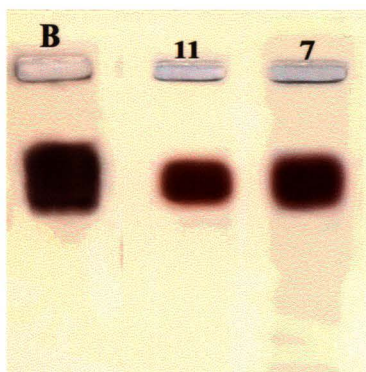


Figura 3: Eletroforese, do padrão (ATCC 3626) tipo B e amostras 11 e 7 de *C. perfringens*, corada para esterase.

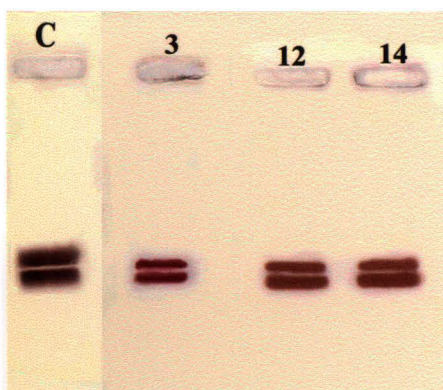


Figura 4: Eletroforese, do padrão (ATCC 3628) tipo C e amostras 3, 12 e 14 de *C. perfringens*, corada para esterase.

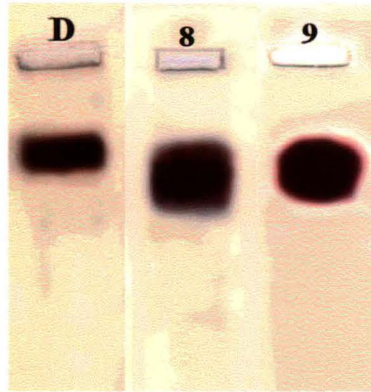


Figura 5: Eletroforese, do padrão (ATCC 3629) tipo D e amostras 8 e 9 de *C. perfringens*, corada para esterase.

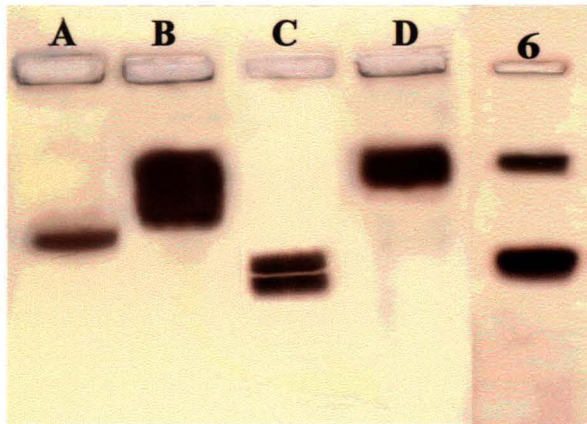


Figura 6: Eletroforese, dos padrões tipo A (ATCC 3624), B (ATCC 3626), C (ATCC 3628) e D (ATCC 3629) e amostra indeterminada (6) de *C. perfringens*, corada para esterase.

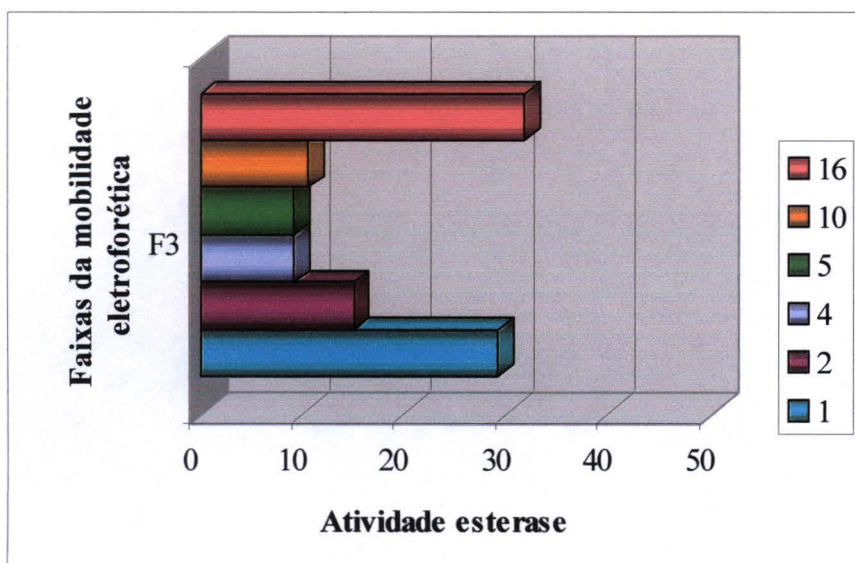


Gráfico 2: Densitometria das cepas considerando mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase, das amostras (1, 2, 4, 5, 10, 16) do *C. perfringens* do tipo A. F3 (2,8-3,9cm).

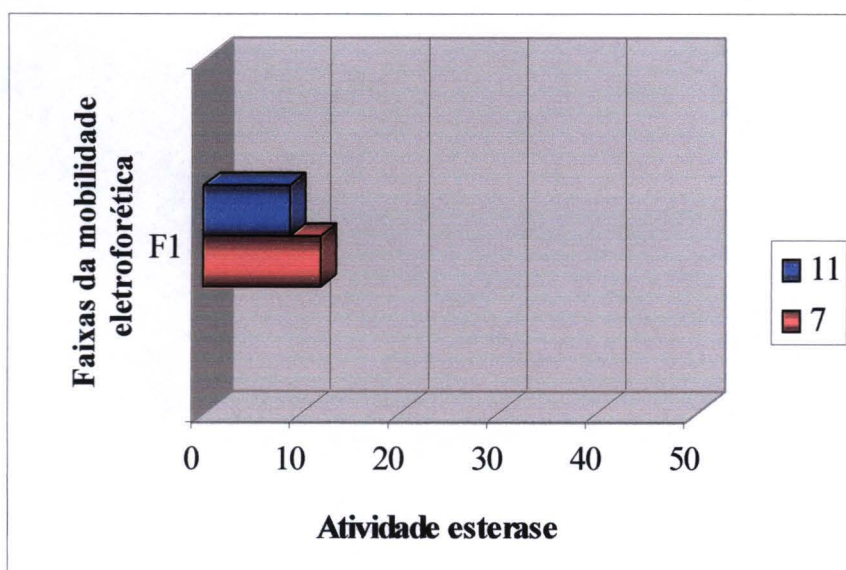


Gráfico 3: Densitometria das cepas considerando mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase, das amostras (7, 11) do *C. perfringens* tipo B. F1 (1,87-2,9 cm).

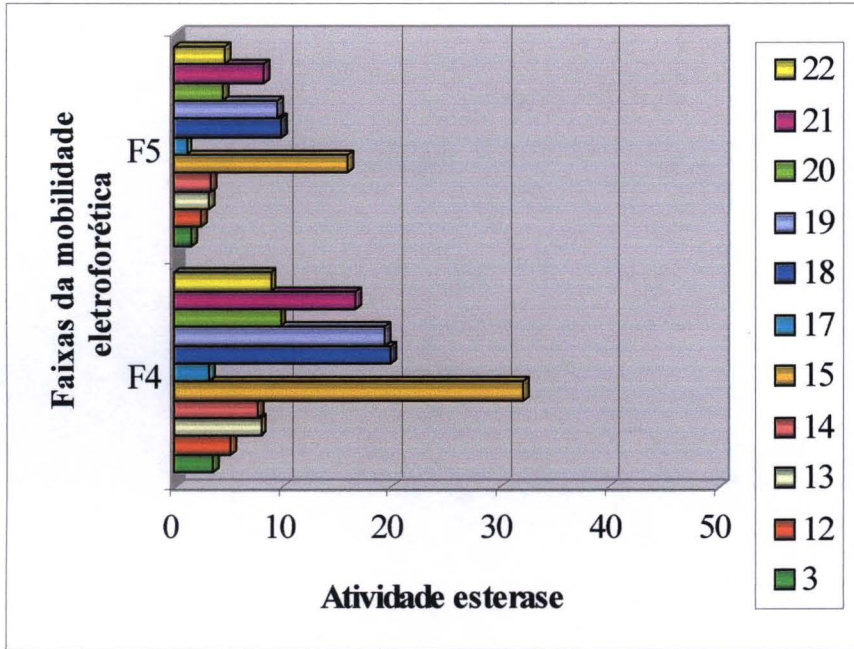


Gráfico 4: Densitometria das cepas considerando mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase, das amostras (3, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22) do *C. perfringens* tipo C. F5 (4,98-5,50 cm); F4 (3,94-4,96 cm).

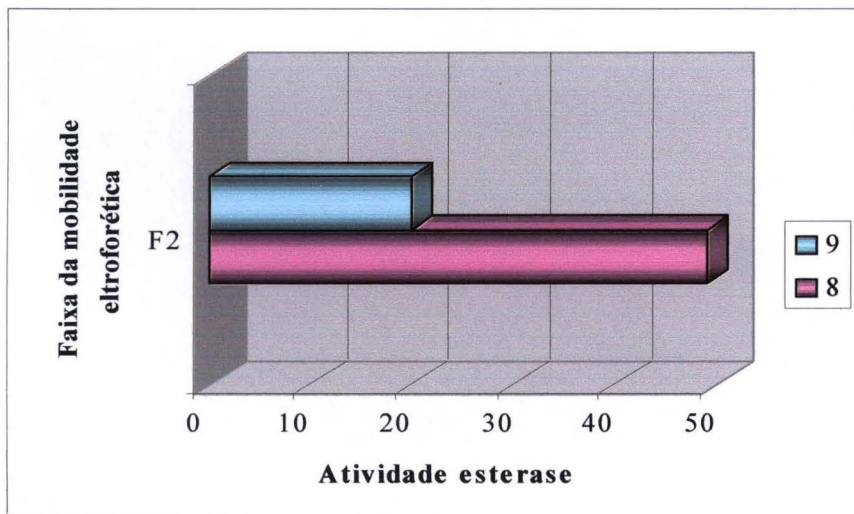


Gráfico 5: Densitometria das cepas considerando mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase, das amostras (8, 9) do *C. perfringens* tipo D. F2 (2,5- 3,65 cm).

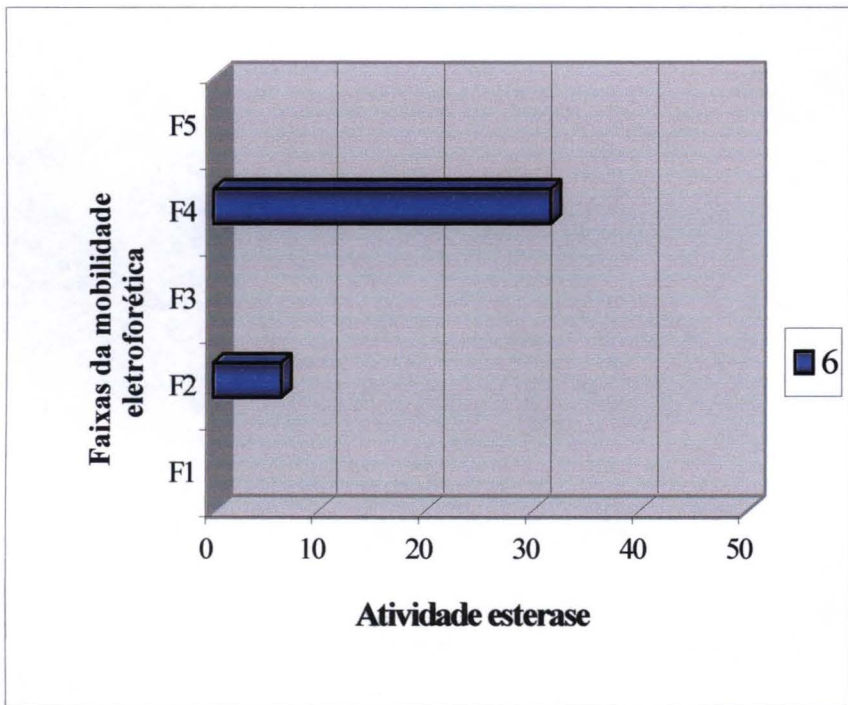
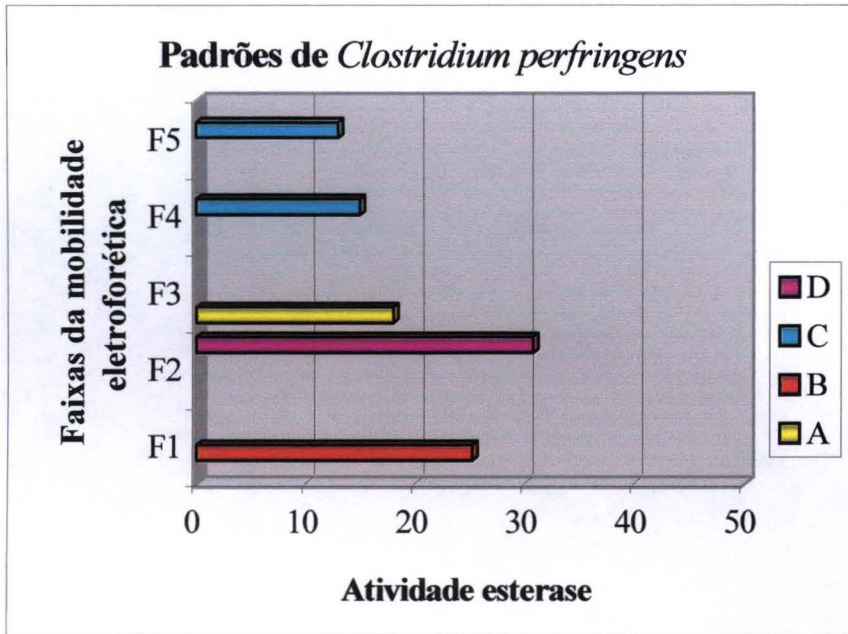


Gráfico 6: Densitometria da cepa (6) indeterminada e padrões A, B, C e D de *C. perfringens* considerando mobilidade eletroforética (cm) e atividade esterase. F1 (1,87-2,9 cm); F2 (2,5-3,65 cm); F3 (2,8-3,9 cm); F4 (3,94-4,96); F5 (4,98-5,50).

O Gráfico 7, demonstra que do total de (22) cepas (aves e bovinos), 50% (11) pertenciam ao tipo C; 27% (6) ao tipo A; 9% (2) ao tipo B, 9% (2) ao tipo D enquanto 5% (1) permaneceu indeterminada.

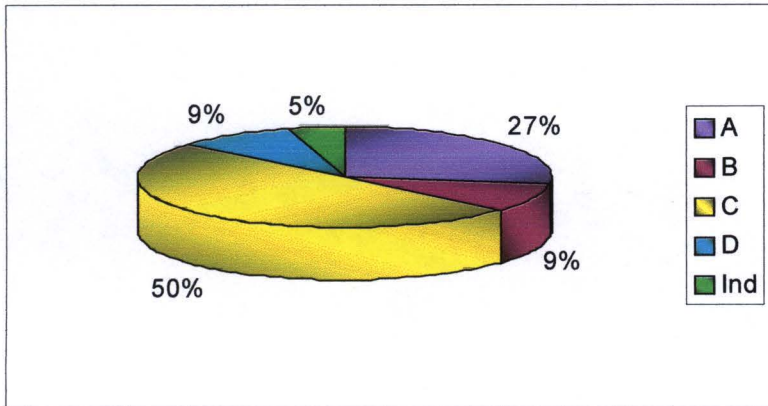


Gráfico 7: Porcentagem total dos tipos A, B, C e D e indeterminado de *C. perfringens* dentro das 22 cepas de origem bovina e aviária.

Dentre as 22 cepas das quais 11 foram provenientes de bovinos e 11 de aves, foi possível determinar que os tipos A e C foram observados em aves e bovinos enquanto que os tipos B e D somente em bovinos (Gráfico 8).

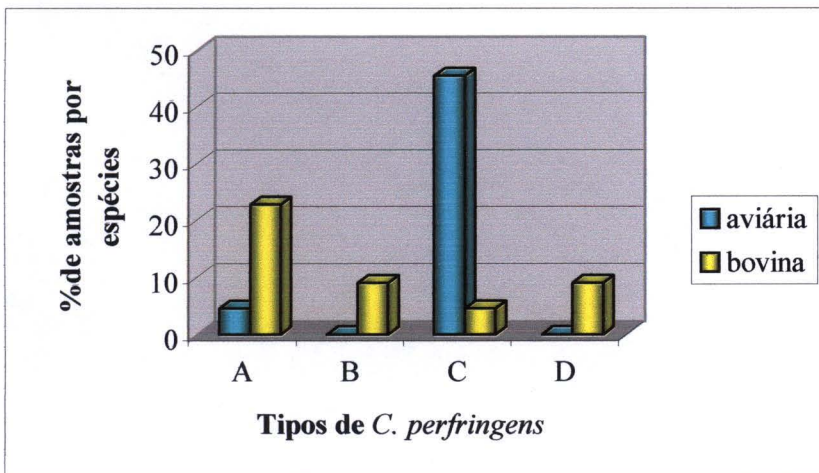


Gráfico 8: Porcentagem de cepas de origem bovina e aviária em relação aos tipos A, B, C e D do *C. perfringens*.

Para o total de 11 amostras de origem aviária foram obtidas 10 cepas do tipo C correspondendo a 90,9%, as quais foram isoladas a partir de fígado (36,36%), coração (18,18%), intestino (27,27%) e músculo (9,09%). Apenas uma cepa isolada a partir do fígado (16,6%) foi tipificada como tipo A (Gráfico 9).

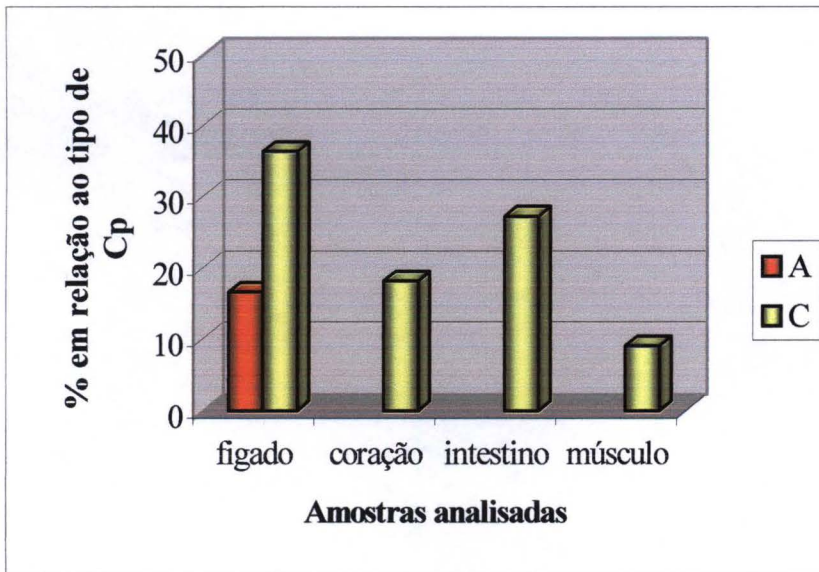


Gráfico 9: Porcentagem dos tipos A e C de *C. perfringens* em relação ao material de origem aviária. Material clínico músculo, intestino, coração e fígado.

Para os bovinos do total de 11 cepas, 5 foram pertencentes ao tipo A, isoladas de 2 (18,18%) amostras de fezes, 1 (9,09%) de músculo e 2 (18,18%) de rim. Para o tipo B das 2 (100%) amostras isoladas 1 foi proveniente de gânglio e 1 de intestino, enquanto que, para o tipo D das 2 cepas isoladas, 1 foi proveniente de intestino e 1 de canela. Somente 1 cepa foi isolada a partir de fígado e caracterizada como tipo C (Gráfico 10).

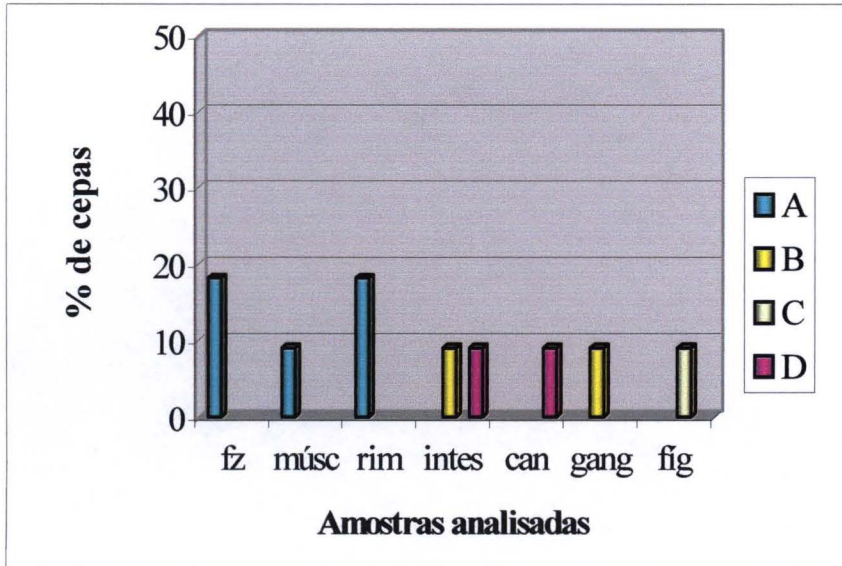


Gráfico 10: Porcentagem dos tipos A, B, C e D de *C. perfringens* em relação a amostra de fezes (fz), músculo (músc), rim, intestino (intes), canela (can), gânglios (gang) e fígado (fig) de origem bovina.

6. DISCUSSÃO

O *Clostridium perfringens* identificado como anaeróbio, gram-positivo, formador de esporos, tem sido encontrado no trato gastrointestinal de humanos, animais (ROOD 1998; CHEUNG e ROOD 2000) e no solo (SWARTZ 1990). Esta bactéria causa gangrena gasosa, toxinfecção alimentar e enterite necrótica em humanos e animais (ROOD 1998; CHEUNG e ROOD 2000).

A habilidade deste organismo de produzir toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) (STERNE e WARRACH 1964) possibilitou sua classificação em 5 tipos (A, B, C, D, E) além de determinar sua patogenicidade (McDONEL 1986; ROOD e COLE 1991).

A caracterização estabelecida do *C. perfringens* tem sido baseada na técnica de soroneutralização em camundongos, entretanto para esta metodologia se faz necessário a aquisição de antissoros tipo-específicos além de animais de laboratório (DOWEL e HAWKINS 1974; GIUGLIANO e col. 1983).

Existem várias outras metodologias para a caracterização como tipificação por bacteriocinas (MAHONY 1974), características de letalidade e dermonecrose (OAKLEY e WARRACK 1953), teste de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) (BALDASSI 2002) entre outros, entretanto todos inconvenientes, pois para a realização destes, são necessários animais de laboratório, antissoros tipo-específicos e equipamentos adequados.

A eletroforese tem sido outra metodologia empregada na caracterização de microrganismos como observado primeiramente por MILKMAN (1973) trabalhando com *Escherichia coli* e posteriormente por vários outros pesquisadores como STROM e col. (1976); SWINDLEHURST e col. (1977) e POXTON e BROWN (1979) todos utilizando eletroforese protéica.

Segundo GOULLET e PICARD (1990) e CASTRO e BACH (1993), a análise eletroforética envolvendo enzimas, tem sido empregada para estudos taxonômicos, epidemiológicos e de genética de populações. A enzima esterase pode também diferenciar bactérias de uma mesma espécie, segundo a mobilidade eletroforética e tipo de isoesterase como observado por GOULLET e PICARD (1990); PONS e col. (1993); BALDASSI (1998).

As cepas isoladas foram submetidas a caracterização bioquímica, demonstrando que todas as 22 fermentaram a glicose, 13 a lactose, 11 a maltose e 13 a sacarose. Segundo HOLDEMAN e MOORE (1972) estas fermentações não são suficientes para a identificação da espécie havendo a necessidade de complementar com a hidrólise da gelatina e produção da hemólise e lecitinase e fermentação do leite. Realizados estes testes, foi provado ser *C. perfringens*, entretanto sem caracterizar o tipo.

Para a caracterização do tipo, baseou-se em BALDASSI (1998) onde primeiramente foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida corada para esterase, para amostras padrão ATCC. Cada padrão apresentou bandas específicas

para cada tipo sendo também observada a atividade esterásica para cada uma. Assim, o tipo A apresentou Rm de 2,8-3,9 cm com pico característico em 3,35 cm; o tipo B o Rm foi de 1,87-2,9 cm com pico em 2,38 cm; o tipo C com duas bandas com Rm de 3,94-4,96 cm e 4,98-5,50 cm e picos de 4,45 e 5,24cm enquanto, o tipo D demonstrou Rm de 2,5-3,65 cm e pico de 3,075cm. Estas mobilidades eletroforéticas e os referidos picos vêm demonstrar que cada tipo apresenta uma região específica na corrida isto é, isoenzimas diferentes capazes de tipificar os padrões de *C. perfringens*. Esta técnica tem a vantagem de não necessitar do uso de modelos animais e antisoros tipo-específicos, o que a torna adequada para a rotina laboratorial.

Baseando-se no resultado obtido com cepas padrão, foram analisadas as cepas isoladas de casos clínicos oriundas de aves e bovinos. Das 22 cepas isoladas, 6 foram determinadas como tipo A (27% do total) , 2 tipo B (9% do total), 11 tipo C (50% do total), outras 2 tipo D (9% do total) e uma indeterminada (5% do total) por apresentar duas bandas sendo uma correspondente ao tipo C e outra com o tipo D.

Dentre as 22 amostras, 11 foram de bovinos e 11 de aves, nas quais foi possível determinar, por eletroforese que aves apresentaram o tipo A (4,54%) e C (45,46%) enquanto para bovinos foram observados os quatro tipos (A, B, C e D).

Segundo STERNE e BATTY (1975) e NILO (1980), o *C. perfringens* tipo A pode estar associado a enterotoxemia em bezerras e enterite em aves (WALKER 1990;

PETIT e col. 1999).

Neste estudo, das 11 (50%) cepas de origem bovina estudadas, 5 (22,72%) foram tipificadas como *C. perfringens* tipo A, dados semelhantes aos obtidos por BALDASSI (1998) que verificou 48,3% das suas amostras de bovino serem desse mesmo tipo. LULOV e ANGELOV (1986) (67,7%), JELINSKI e col. (1995) (78,6%) e MANTECA e col. (2001) (70%), mesmo não utilizando a técnica de eletroforese também encontram altas porcentagens do tipo A em bovinos. Em relação as 11 (50%) cepas de origem aviária estudadas somente 1 (4,54%) se enquadra nesse tipo, resultado este semelhante aos de BALDASSI e col. (1997) que ao tipificar por eletroforese corada para esterase cepas isoladas de surtos em granjas avícolas não encontrou nenhuma cepa pertencente a esse tipo.

O tipo B do *C. perfringens* relaciona-se na sua maioria com enterites necróticas em potros, suínos, caprinos e ovinos (GAIGER e DALLING 1923; MASSON e col. 1931; BROOKS e ENTESSAR 1957; GKIOURTZIDIS e col. 2001). Nesse estudo das 11 (50%) cepas obtidas de bovinos, 2 (9,09%) eram de *C. perfringens* tipo B, sendo este resultado diferente dos encontrados pelos autores citados e por BALDASSI (1998) em que a menor porcentagem encontrada foi desse tipo (3,4%). Dentre as 11 (50%) cepas estudadas de origem aviária não foi verificada a presença desse tipo, estando de acordo com STERNE e BATTY (1975) e WALKER (1990).

BUOGO e col. (1995) descrevem que o *C. perfringens* tipo C é responsável por enterite necrótica em bovinos, suínos e ovinos, entretanto os resultados obtidos nesse estudo com bovinos para este tipo, foram diferentes dos deste autor e de BALDASSI

(1998) que encontrou 20, 2% das amostras para este tipo, pois dos resultados obtidos nessa pesquisa, das 11 (50%) cepas somente 1 (4,55%) pertencia ao *C. perfringens* tipo C. Já para as cepas de origem aviária estudadas a maior porcentagem foi classificada neste tipo, sendo 45,46% (10 das cepas), resultado este semelhante aos de BALDASSI (1997).

BALDASSI (1998) encontrou 22,5% de *C. perfringens* tipo D, dados semelhantes aos de LULOV e ANGELOV (1986). NILO (1980) relata que este tipo pode ser facilmente isolado da espécie bovina logo após a morte, o que não, necessariamente estaria relacionado com a causa da morte, sendo que este fato poderia explicar as 2 (9,09%) cepas de origem bovina classificadas neste trabalho como tipo D, e a não verificação da presença deste tipo dentre as cepas de origem aviária (WALKER 1990).

O *C. perfringens* tipo A está associado a toxinfecção alimentar (PETIT e col. 1999) e o tipo C com enterite necrótica em humanos (STERNE e BATTY 1975; BUOGO e col. 1995), portanto vale ressaltar que, das 11 (50%) cepas de origem aviária obtidas neste estudo, 1 (4,54%) foi caracterizada como tipo A e encontrada no fígado, enquanto 10 (45,46%) como tipo C e provenientes de: fígado (2); coração (2); intestino (3) e músculo (1). Dentre as 11 (50%) cepas de origem bovina, 5 (22,72%) foram caracterizadas como tipo A, (2) provenientes de fezes, (1) de músculo e (2) de rim, enquanto que para o tipo C foi caracterizada apenas 1 cepa e encontrada no fígado. Esses resultados geram um alerta de risco para a Saúde Pública.

Conforme relatado por BALDASSI (1998) as mortes em bovinos determinadas por *C. perfringens*, ocasionam aos agricultores sérios prejuízos, e por conseqüência à população, pois a oferta proteica é reduzida e ao mesmo tempo quando não ocorre o descarte correto destas carcaças podem se constituir em fonte de DOA (Doenças de Origem Alimentar) podendo então ser considerado como zoonose.

Levando-se em consideração os resultados obtidos por AUDI (2002) ao avaliar o comércio ambulante de produtos cárneos tanto de origem bovina quanto aviária, incluindo-se a comercialização de vísceras, em feiras livres e os deste estudo, deve-se alertar as autoridades de Saúde Pública para o perigo de comercialização deste tipo de alimentos, sem que tenham sido submetidos à inspeção sanitária.

7 CONCLUSÕES

1. Foram isoladas de órgãos e excreções, 22 (100%) cepas identificadas bioquimicamente como *C. perfringens*, sendo 11 (50%) de origem bovina e 11 (50%) de origem aviária.
2. Do total das 22 (100%) cepas estudadas, a eletroforese corada para esterase permitiu tipificar o *C. perfringens* nos seguintes tipos: A (27%), B (9%), C (50%) e D (9%).
3. Dentre as 11 (50%) cepas de origem aviária foi possível observar que 1 (4,54%) foi do tipo A e 10 (45,46%) do tipo C, enquanto que para os bovinos do total de 11 (50%), 5 (22,72%) foram do tipo A, 2 (9,09%) do tipo B, 2 (9,09%) do tipo D, 1 (4,55%) do tipo C de *C. perfringens*, sendo que 1 (4,55%) foi considerada indeterminada.
4. Para o total de 6 (100%) cepas caracterizadas como *C. perfringens* tipo A, 1 (16,6%), de origem aviária, foi isolada de fígado, enquanto que as 5 (83,3%) restantes, de origem bovina, 2 (33,3%) eram provenientes de fezes, 1 (16,6%) de músculo e 2 (33,3%) de rim.
5. Para o *C. perfringens* tipo C foram caracterizadas 11 (100%) cepas, sendo 10 (90,9%) de origem aviária, obtidas a partir de fígado 4 (36,36%), de coração 2 (18,18%), de intestino 3 (27,27%) e de músculo 1 (9,09%). Apenas 1 (9,09%)

cepa foi de origem bovina a qual foi obtida a partir de amostra de fígado.

6. Os tipos B e D do *C. perfringens* foram encontrados somente nas cepas de origem bovina, sendo 2 (100%) cepas do tipo B, obtidas a partir de 1 (50%) amostra de gânglio e 1 (50%) de intestino. Foram isoladas 2 (100%) cepas do tipo D, sendo, 1 (50%) a partir do intestino e 1 (50%) de canela.
7. Considerando-se que fígado, rim, coração e músculo são produtos destinados ao consumo humano e os tipos A e C de *C. perfringens* estarem relacionados a patogenia em humanos, e neste estudo terem sido encontrados o tipo A em 27% das amostras e o tipo C em 50% das amostras, há o perigo para a saúde do consumidor.
8. A eletroforese corada para esterase é uma técnica de fácil realização e sensível o que permite sua utilização como método para tipificação em rotina laboratorial.

7. REFERÊNCIAS*

Achalme MP. Examen bactériologique d'un cas de rhumatisme articulaire aigu mort de rhumatisme cérébral. **C R Soc Biol.** 1891; 43: 651-6.

Al-Sheikhly F. Studies on the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Dissert Abs Internat.** 1977; 38-B(1): 69-72.

Al-Sheikhly F, Truscott RB. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into duodenum. **Avian Dis.** 1977a; 21: 241-255.

Al-Sheikhly F, Truscott RB. The interation of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. **Avian Dis.** 1977b; 21: 256-263.

Al-Sheikhly F, Al-Saieg A. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Dis.** 1980; 24: 324-333.

Audi SG. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias das feiras-livres do município de São Paulo.** São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado Faculdade Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

* De acordo com as Normas de Redação para Tese da Faculdade de Saúde Pública (1998)

- Bacciarini LN, Pagan O, Frey J, Grone A. *Clostridium perfringens* beta-2 toxin in na African elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis. **Vet Rec.** 2001; 149(20): 618-620.
- Bach EE. **Comparação morfológica, patogênica, sorológica e eletroforética de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs., isolado de milho, sorgo e capim massambará.** Piracicaba; 1991. [Dissertação de Mestrado- Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz].
- Baldassi L, Hipólito M, Bucholtz E, Guerra JL. *Clostridium perfringens* isolado de caso de enterite necrótica hemorrágica em cães. **Biológico**, São Paulo. 1986; 52(4/6): 37-41.
- Baldassi, L, Hipólito M, Portugal MASC, Calil EMB, Moulin AAP. Presença de *Clostridium perfringens* em sistema nervoso central de bovinos apresentando sintomatologia nervosa. **In: Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**; 1988 jul 7; Salvador(BA).
- Baldassi L, Castro AGM, Guerra JL, Portugal MASC, Calil BEM, Macruz R. Necrotic enteritis on broilers in São Paulo state. **Arq Inst Biol.** São Paulo. 1995a; 62(1/2): 37-43.
- Baldassi, L, Calil EMB, Portugal MASC, Moulin AAP, Mourão MAF. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Braz J Vet Res Anim Sci.** 1995b; 32:109-113.

Baldassi L, Barbosa ML, Bach EE. Tipificação de cepas de *C. perfringens* de origem aviária, por análise da mobilidade da esterase. **In: Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia** 1997; p. 114 Rio de Janeiro (RJ).

Baldassi L. **Verificação da toxigenicidade de cepas de *Clostridium perfringens* isoladas de material de origem bovina e sua tipificação pelo ensaio imunoenzimático e eletroforese corada para esterase.** São Paulo, 1998 [Tese de Doutorado - Faculdade Saúde Pública da USP].

Baldassi L, Barbosa ML, Bach EE, Iaria ST. Toxigenicity characterization of *Clostridium perfringens* from bovine isolates. **J Venom Anim Toxins.** 2002; 8: 112-126.

Ballows A. Anaerobic bacteria perspectives. **In: Anaerobic bacteria: role in disease.** Ballows, A, Dehaan, R, Dowell Jr, V.R, Guze , LB. Springfield. Charles C & Thomas; 1975. p. 9- 20.

Bartholomew BA, Stringer MF. Observations on the purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin and production of a specific antiserum. **FEMS Microbiol.** 1983; 18: 43-8.

Bean NH, Griffin PM. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987, pathogens, vehicles and trends. **J Food Prot** 1990; 53: 804-817.

Beer J. Infecções e intoxicações por *Clostridium perfringens*. In: **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Ed. Roca, 1988; 2: 234-250.

Bennetts HW. Infectious enterotoxemia (the so-called braxy-like disease) of sheep in western Australia. **Bull Coun Sci Indust Res Austral**. 1932, 57.

Berg JN, Fales WH, Scalan CM. Occurrence of anaerobic bacteria in disease of the dog and the cat. **Am J Vet Res**. 1979, 40(6): 876-881.

Berkhoff GA, Campbell SG. Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (Quail disease) - The experimental disease. **Avian Dis**. 1973; 18(2): 205-212.

Berkhoff GA, Campbell SG, Naylor HB. Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (Quail disease) - isolation of a causative anaerobe. **Avian Dis**. 1973a; 18(2): 186-194.

Berkhoff GA, Campbell SG, Naylor HB, Smith LDS. Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (Quail disease) characterization of the causative anaerobe. **Avian Dis**. 1973b; 18(2): 195-204.

Berkhoff GA. Ulcerative enteritis - Clostridial antigens. **Am J Vet Res**. 1975; 36: 583-585.

Bildfell RJ, Eltzroth EK, Songer JG. Enteritis as a cause of mortality in the western bluebird (*Sialia mexicana*). **Avian Dis.** 2001; 45(3): 760-763.

Billington SJ, Wieckowski EU, Sarker MR, Buschel D, Songer JG, McClane BA. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. **Infection and Immunity.** 1998; 66: 4531-4536.

Blood DG, Henderson JA. **Medicina Veterinária** 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Kogan; 1978, 871.

Borriello SP, Larson HE, Welch AR, Barclay F, Stringer MF, Bartholomew BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic associated diarrhea. **Lancet, i.** 1984; 305-7.

Bosworth TJ. On a new type of toxin produced by *Clostridium welchii*. **J Comp Pathol Ther.** 1943; 53: 245-255.

Brandão AP. **Tipificação de amostras de *Clostridium perfringens* isoladas de fezes humanas e solo.** São Paulo, 1980 [Tese de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro].

Brooks ME, Entessar F. Anomalous *Clostridium welchii* type B strains isolated in Iran. **Brit Vet J.** 1957;113: 506-8.

Brooks ME, Sterne M, Warrack GH. A re-assessment of the criteria caused for type differentiation of *Clostridium perfringens*. **J Pathol Bacteriol.** 1957; 74: 185-195.

Broussard CT, Hofacre CL, Page RK, Fletcher OJ. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. **Avian Dis.** 1986; 30(3): 617-618.

Buddle MB. Degraded strains of *Clostridium welchii* type C isolated from sheep in New Zeland. **J Comp Path Ther.** 1954;64: 223-4.

Bull CG, Pritchett IW. Toxin and antitoxin of and protective inoculation against *Bacillus welchii*. **J Exp Med.** 1917; 26: 119-38.

Buogo C, Capaul S, Häni H, Nicolet J. Diagnosis of *Clostridium perfringens* type C enteritidis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). **J Vet Med Series B.** 1995; 42; 51-58.

Carman RJ, Levis JCM. Recurrente diarrhea in dog associated with *Clostridium perfringens* type A. **Vet Rec.** 1983; 112(15): 342-343.

Carvalho CB, Saraiva D, Barros CS, Silveira JF. Toxinfecção mortal em canino por *Clostridium perfringens* tipo A. **Revista do Centro de Ciências Rurais.** 1976; 6(2): 211-215.

Castro TAMG, Bach EE. Eletroforese na agricultura. **Zootecnia.** Nova Odessa. 1993; 3: 73-88.

Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 9th ed. 2. Williams & Wilkins, Baltimore. 1986; p.1142-1200.

Chalmers GA. An ulcerative enteritis of racing pigeons. **Can Vet J.** 1990; 21: 165-166.

Changqing Q, Xueli Y. Clostridium infection (jisizheng) in yaks in Qinghai, China. **Vet Res Commun.** 2001; 25(7): 555-63.

Chen YM, Lee HC, Chang CM, Chuang YC, Ko WC. *Clostridium* bacteremia: emphasis on the poor prognosis in cirrhotic patients. **J Microbiol Immunol Infect.** 2001;34(2):113-8.

- Chetoui H, Delhalle E, Osterrieth P, Rousseaux D. Combination of biotyping and electrophoretic patterns of esterases for differentiation of nosocomial *Serratia marcescens* strains. **Res Microbiol.** 1995; 146: 579-586.
- Cheung JK, Rood JJ. The VirR Response Regulator from *Clostridium perfringens* Binds Independently to Two Imperfect Direct Repeats Located Upstream of the pfoA Promoter. **J Bacteriol.** 2000; 182: 57-66.
- Coignoul F, Dewaele A. Canine haemorrhagic enteritis pathology of a syndrome. **Ann Anim Pract.** 1979; 123(1): 47-54.
- Cowen BS, Schwartz LD, Wilson RA, Ambrus SI. Experimentally induced necrotic enteritis in chickens. **Avian Dis.** 1987; 31: 904-906.
- Craig JP, Miles AA. Some properties of the iota-toxin of *Clostridium welchii* its action on capillary permeability. **J Pathol Bacteriol.** 1961; 81: 481-493.
- Craven SE, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. **Avian Dis.** 2001;45(4): 887-96.
- Cruz F, Iturrino RPS, Sorbara JOB, Andreoli P. Pesquisa de *Clostridium perfringens* na enterite de aves de exploração comercial e sua sensibilidade a antibióticos

utilizados no seu controle e prevenção. **In: II Fórum Em Microbiologia 1998**
Jaboticabal (SP).

Dalling T, Roos HE. *Clostridium Welchii*: Notes on the relationship between the
types of cultures and the production of toxin. **J Comp Path Ther.** 1938; 51:
235-49.

Davis RB, Brown J, Dawe DL. Quail - biological indicators in the differentiation of
ulcerative and necrotic enteritis of chickens. **Poult Sci.** 1971; 50: 737-740.

Dennison AC, VanMetre DC, Callan RJ, Dinsmore P, Mason GL, Ellis RP.
Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: 22 cases (1997-2000). **J Am Vet
Med Assoc.** 2002; 221(5): 686-689.

Dowell VR, Hawkins TM. Laboratory methods in anerobic bacteriology. In
D.H.E.W. **CDC Laboratory manual.** Washington U.S. Governm. Print Publ.
1974; nº 74-8272.

Droual R, Faver TB, Bickford AA. Relationship of Sex, age and courrent intestinal
disease to necrotic enteritis in turkeys. **Avian Dis.** 1995; 39(3): 599-605.

Durant AJ, Doll ER. Ulcerative enteritis in Quail. **Agr Exper Sta Res Bull.** 1941;
325.

- Ellner VR, Bohan CD. Serology of the soluble antigens of *Clostridium perfringens* types A-F by agar-gel diffusion. **J Bacteriol.** 1962; 83: 284-96.
- Estrada A, Baca ME, Taylor D. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens* type A strains isolated from pig diarrhea. **Ver Lat-Amer Microbiol.** 1989; 31:45-50.
- Finegold SM. Anaerobe Infections in Humans: An Overview. **Anaerobe** 1995. vol. 1: 3-9.
- Fukata T, Hadate Y, Baba E, Uemura T, Arakawa A. Influence of *Clostridium perfringens* and toxin in germ-free chickens. **Res Vet Sci.** 1988; 44(1): 68-70.
- Gaiger SH, Dalling T. Bacillary dysentery in lambs. A note on some recent research into the etiology and source of infection. **J Comp Path Ther.** 1923; 36: 120.
- Gardner MR. Clostridial infections in poultry in western Australia. **Aust Vet J.** 1967; 43: 359-360.
- Gazdzinski P, Julian RJ. Necrotic enteritis in turkeys. **Avian Dis.** 1992; 36(3): 792-798.
- Gerber JE. Acute necrotizing bacterial tonsillitis with *C. perfringens* **Am J Forensic Med Pathol.** 2001; 22(2); 177-9.

Gillespie JH, Langley CH. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics** 1974; 76: 837-84.

Giugliano LG, Stringer MF, Drasar BS. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin by tissue culture and double-gel diffusion methods. **J Med Microbiol.** 1983;16: 233-237.

Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, Iliadis N, Sarris K. PCR detection and prevalence of alpha, beta, beta2, epsilon, iota and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. **Vet Microbiol.** 2001; 82(1): 39-43.

Glenny AT, Barr M, Llewellyn-Jones M, Dalling T, Ross HE. Multiple toxins produced by some organisms of the *Clostridium welchii* group. **J Pathol Bacteriol.** 1933;37: 53-74.

Glover JS. Ulcerative enteritis in pigeons. **Can J Comp Med.** 1951; 15: 295-297.

Gough AW, Pettit JR. Ulcerative enteritis in poultry. **Poultry Digest.** 1975; 34(40): 406.

Goulet P, Picard B. Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **J Gen Microbiol.** 1984; 130: 1471-80.

Goulet P, Picard B. Characterization of enterobacteria by esterase specific-activity profiles. **J Gen Microbiol.** 1990;136: 431-40.

Goulet P, Picard B. The electrophoretic polymorphism of bacterial esterases. **FEMS Microbiol Reviews** 1995; 16: 7-31.

Gui L, Subramony C, Fratkin J, Hughson MD. Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult **Mod Pathol.** 2002; 15(1): 66-70.

Gutiérrez A, Gamboa MDM, Rodríguez E, Arias ML. Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica **Archivos Latinoamericanos de nutrición.** 1999; 49(3); 275-78.

Griner LA, Johnson HW. *Clostridium perfringens* type C in haemorrhagic enterotoxaemia of lambs. **J Am Vet Med Assoc.** 1954; 125: 125.

Hall IC. Differentiation and identification of the sporulating anaerobes. **J Infec Dis.** 1922; 30: 445-504.

Hall J A, Goulding JS, Bean NH, Tauxe RV, Hedberg CW. Epidemiologic profiling: evaluating foodborne outbreaks for which no pathogen was isolated by routine laboratory testing: United States, 1982-9 **Epidemiol Infect.** 2001; 127(3): 381-7.

Halpin TF, Molinari JA. Diagnosis and management of *Clostridium perfringens* sepsis and uterine gas gangrena. **Obstet Gynecol Surv.** 2002; 57.

Hauschild AHW. *Clostridium perfringens* toxins types B,C,D and E. In: Kadis, S, Montie, TC & AJL, SJ (Eds). **Microbial toxins- bacterial protein toxins.** New York: Academic Press; 1971. vol. II: p.159-188.

Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. **Clin Microbiol Rev.** 1990; 3(1); 66-98.

Heier BT, Lovland A, Soleim KB, Kaldhusdal M, Jarp J. A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* alpha toxin in Norwegian broiler flocks. **Avian Dis.** 2001; 45(3): 724-732.

Helmboldt CF, Bryant ES. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. **Avian Dis.** 1971; 15: 775-780.

Henderson DW. The somatic antigens of the *C. welchii* group of organisms. **J Hyg.** 1940; 40: 501-512.

Hobbs BC, Oakley CL, Warrack GH, Cruickshank JC. *Clostridium welchii* food poisoning. **J Hyg.** 1953; 51: 75-101.

Holdeman LV, Moore WEC. **Anaerobic Laboratory Manual.** In. Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, 3th Virginia 1972; 132p.

Holliday MG. Rapid identification of *Clostridium perfringens* by counter-immunoelectrophoresis. **Medical Lab Sci.** 1985; 42: 322-325.

Howard A. Races serologiques du *B. perfringens*. **Ann Inst Pasteur (Paris)** 1928; 42: 1403-19.

Humphreys FB. Formation of acrolein from glycerol by *B. welchii*. **J Infec Dis.** 1924; 35: 282-90.

Hunter SEC, Clarke IN, Kelly DC, Titball RW. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity.** 1992; 60(1) 102-110.

Igoe MJ, Truant AL, Mechanic SA. *Clostridium perfringens* induced massive intravascular hemolysis complicating the course of colonic carcinoma. **Clinical Microbiol.** 2002; 24(9): 69-70.

Iturrino RPS, Medeiros AA, Ávila FA, Sorbara JO, Carneiro MC. Infecção em frangos de corte com *Clostridium perfringens*: reisolamento e teste de eficácia de promotores crescimento. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. 2001; 1: 98.

Jelinski MD, Ribble CS, Chirino-Terjo M, Clark EC, Janzen ED. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens* type A, *Campylobacter* spp or fungi fatal abomasal ulcers in unweaned beef calves. **Can Vet J**. 1995; 36(6): 379-382.

Kessel AS, Gillespie IA, O'brien SJ, Adak GK, Humphrey TJ, Ward LR. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999 **Commun Dis Public Health**. 2001; 4(3): 171-7.

Kohn J, Warrack GH. Recovery of *Clostridium welchii* type D from man. **Lancet** 1955; 1: 385.

Kwatra MS, Chaudhury B. A presumptive diagnosis of avian necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) from Assam (India). **Avian Dis**. 1976; 20(2): 401-406.

Labbé R. Symposium on microbiology update old friends and new enemies *Clostridium perfringens*. **J Off Anal Chem**. 1991; 74: 711-14.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** 1970; 227: 680-5.

Larson HE, Borriello SP. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*. **J Infect Dis.** 1988; 157: 390-1.

Long JR. Necrotic enteritis in broiler chickens I- A review literature and prevalence of the disease in Ont rio. **Can J Comp Med.** 1973; 37(3): 302-312.

Long JR, Pettit JR, Barnum DA. Necrotic enteritis in broiler chickens. II Pathology and proposed pathogenesis. **Can J Comp Med.** 1974; 38: 467-474.

Lulov R, Angelov AK. Enterotoxemia in newborn calves due to *Clostridium perfringens* types A, C and D. **Vet Med Nauki.** 1986; 23(5): 20-28.

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 Environ Microbiol.** 2002; 68(8): 3744-3749.

MacKay NNS, Gruneberg RN, Harries BJ, Thomas PK. Primary *Clostridium welchii* meningitis. **Br Med J.** 1971; 1: 591-592.

MacLennan JD. Histotoxic clostridial infection of man. **Bacteriol Reviews.** 1962; 26(2): 177- 276.

- Mahony DE. Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens*: a provisional typing schema. **Appl Microbiol.** 1974; 28: 172-6.
- Mahony DE. Bacteriocin, bacteriophage and other epidemiological typing methods for the genus *Clostridium*. In: Bergan, T.; Norris, J.R. **Methods in Microbiology.** New York: Academic Press; 1979. vol. 13: p. 1-30.
- Manteca C, Daube G, Pirson V, Limbourg B, Kaeckenbeeck A, Mainil JG. Bacterial intestinal flora associates with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. **Vet Microbiol.** 2001; 81(1): 21-32.
- Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Linden A, Pirson V, Detilleus J, Ginter A, Coppe P, Kaeckenbeeck A, Mainil JG. A role for the *Clostridium perfringens* β_2 toxin in bovine enterotoxaemia? **Vet Microbiol.** 2002; 86: 191-202.
- Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions **Int J Food Microbiol.** 2001; 68(1-2): 149-53.
- Masson JH, Roos HE, Dalling T. *B. paludis* (McEwen): a comparison with the Lamb Dysentery Bacillus. **J Comp Path Ther.** 1931; 44: 258.
- Meyer M, Tholozan JL. A new growth and *in vitro* sporulation medium for *Clostridium perfringens*. **Appl Microbiol.** 1999;28:98-102.

McClane BA, McDonel JL. Effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability and macromolecular synthesis in Vero cells. **J Cell Physiol.** 1979; 99:191-200.

McDonel JL, McClane BA. Binding versus biological activity of *Clostridium perfringens* enterotoxin in Vero cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 1979; 87: 497-504.

McDonel, JL. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmac Ther.** 1980; 10(3): 617-55.

McEwen AD. *Bacillus paludis*: a new species of pathogenic anaerobic bacterium. **J Comp Pathol Therap.** 1930; 43: 1-21.

Milkman R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. **Science** 1973; 182: 1024-1026.

Muller W, Zucker BA, Sanches AR, Ulmer S, Younan M. Short communication: bovine paraplegic syndrome (Mal de Aquidaban) in Paraguay caused by *C. perfringens* toxovar D. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** 1998; 111(6): 214-216.

Murrel TGC, Roth L. Necrotizing jejunitis: a newly discovered disease in the highlands of New Guinea. **Med J Aust.** 1963; 50:61.

Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease a review of current knowledge.

Can Vet J. 1980; 21(5): 141-8.

Niilo L, Avery RJ. Bovine enterotoxemia I. *Clostridium perfringens* isolated from animal sources in Alberta and Saskatchewan. **Can J Microbiol.** 1963; 4: 31-36.

Nobre D, Portugal MASC, Chapellaro CEMPM, Nakano M, Chiarelli V. Enterite ulcerative em Uru (*Odontophorus capueira*) In: Conferência Anual Da Sociedade Paulista De Medicina Veterinária. 28, 1973, Resumos. **Atual Vet.** 2(9): 48.

Oakley CL. The toxins of *Clostridium welchii*. A critical review. **Bull Hyg.** 1943; 18: 781-806.

Oakley CL, Fulthorpe AJ. Antigenic analysis by diffusion. **J Pathol Bacteriol.** 1953; 65: 49-60.

Oakley CL, Warrack GH. Routine typing of *Clostridium welchii*. **J Hyg.** 1953; 51: 102-7.

Ochman H, Whittam TS, Caugant DA, Selander RK. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. **J Gen Microbiol.** 1983; 129: 2715-2726.

Orlans ES, Jones VE. Studies on some soluble antigens of *Clostridium welchii* types B, C and D. **Immunology** 1958; 1: 268-90.

Ornstein L, Davis BJ. Disc Electrophoresis. **Ann N Y Acad Sci.** 1964; 121, 321-349.

Orr JH, Reed GB. Serological types of *Clostridium perfringens*. **J Bacteriol.** 1940; 40: 441-8.

Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. **J Comp Pathol.** 1961a; 71: 377-393.

Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. **J Comp Pathol.** 1961b; 71: 394-404.

Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. **J Comp Pathol.** 1961c; 71: 405-413.

Peckham MC. An anaerobe, the cause of ulcerative enteritis. (Quail disease). **Avian Dis.** 1959; 3: 471.

Peckham MC. Ulcerative enteritis (Quail disease) In: Diseases of poultry. Ed. HOFSTAD, M. S. 8th ed., p. 242-250, 1984. Iowa. State university press. Ames, Iowa.

Perelle S, Gibert M, Boquet P, Popoff MR. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity** 1993; 61(12): 5147-5156.

Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology** 1999; 7(3): 104-110.

Picard B, Goulet P. Epidemiological complexity of hospital *Aeromonas* infections revealed by electrophoretic typing of esterases. **Epidemiol Infect.** 1987; 98: 5-14.

Pimenta ALP, Cruz JB, Aquino MHC, Gonçalves WM, Chagas WA. Infecção por *Clostridium perfringens* em cães no Rio de Janeiro. **Rev Inter de Zoonoses** 1989; 1(1): 21-24.

Pivinick H, Hauschild AHW, Gorenstein B, Habeeb AFSA. Effect of pH on toxinogenesis by *Clostridium perfringens* type D. **Can J Microbiol.** 1965; 11: 45-55.

Pons JL, Picard B, Niel P, Leluan G, Goulet P. Esterase électrophoretic polymorphism of human and animal strains of *Clostridium perfringens*. **Appl Environm Microbiol.** 1993; 59(2): 496-501.

Poxton IR, Brown R. Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis of cell surface proteins as an aid the identification of the *Bacteroides fragilis* group. **J Gen Microbiol.** 1979; 112: 211-217.

Raymond S, Weintrau BL. Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. **Science** 1964; 130: 711.

Redinbaugh MG, Tuley RB. Adaptation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay for use with Microtiter Plates and sucrose gradient fractions. **Anal Biochem.** 1986; 153: 267-271.

Rho MJ, Chung MS, Lee JH, Park J. Monitoring of microbial hazards at farms, slaughterhouses, and processing lines of swine in Korea. **J Food Prot.** 2001; 64(9): 1388-1391.

Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiology Reviews** 1991; 55(4): 621-648.

Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Reviews in Microbiology.** 1998; 52: 333-360.

Rose AL, Edgar G. Enterotoxemia jaundice of sheep and cattle. **Austral Vet J.** 1936; 12: 212.

Rosenblum BN, Gutwein M, Bartell MF. Sphenoid sinusitis caused by *Clostridium perfringens*. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2001; 125(1):101-2.

Ross HE, Warren ME, Barnes JM. *Clostridium welchii* iota toxin: its activation by trypsin. **J Gen Microbiol.** 1949; 3: 148-152.

Salzberg SP, Massaguer PR, Serrano AM. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Rev Microbiol.** 1982; 13: 26-30.

Satija KC, Narayan KG. Passive bacteriocin typing of strains of *Clostridium perfringens* type A causing food poisoning for epidemiologic studies. **J Infect Dis.** 1980; 142: 899-902.

Saxena AK, Schleef J, Morcate JJ, Schaarschmidt K, Willital GH. Thermography of *C. perfringens* infection in childhood. **Pediatr Surg Int.** 1999; 15: 75-76.

Scanlan CM, Edwards JF. Bacteriologic and pathologic studies of hepatic lesions in sheep. **Am J Vet Res.** 1990; 51(3): 363-366.

Scott HG, Mahony DE. Further development of a bacteriocin typing system for *Clostridium perfringens*. **J Appl Bacteriol.** 1982; 53: 363-9.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS.

Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl Environ Microbiol.** 1986; 51: 873-884.

Simonds JP. Classification of the *Bacillus welchii* group of bacteria. **J Infect Dis.**

1915; 16: 31-4.

Smith LDS, Hobbs G. Genus *Clostridium* Prazmowski, 1880. In: Buchanan, R E &

Gibbons, NE; Williams & Wilkins (co-eds). **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 8th. ed. Baltimore; 1974; 551-72.

Smith LDS. **The pathogenic anaerobic bacteria.** Springfield (Illinois), Charles C.

Thomas Publ., 1975.

Smith LDS. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Infectious**

Diseases. 1979; 1(2): 254-260.

Smith PK, Krhon RI, Hermanson AK, Mallia AK, Gartner FH, Provenzo MD,

Fujimoto EK, Goeke M, Olson BJ, Klenl DC. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal Biochem.** 1985; 150: 76-85.

Souza TL, Tórtora JCO. *Clostridium perfringens* enterotoxigênico em carne moída

bovina no Rio de Janeiro. **Rev Microbiol.** 1986; 17(4): 356-363.

Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic associated diarrhea and food poisoning in North America. **J Clin Microbiol.** 2001; 66(3):883-8.

Stegemann H, Francksen H, Macko V. In: Weber, K.; Osborn, M. The Reliability of molecular weight determinations by Dodecyl sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis. **J Biol Chemistry** 1969; 244(16): 4406-4412.

Stephen AD, Jean AS, Linda MM. Isolation and examination of anaerobic bacteria. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. **Manual of clinical Microbiology**; 4th ed. Washington: American Society of Microbiology. 1985: p. 1149.

Sterne M, Batty I. **Pathogenic Clostridia**. London: Butterworth and Co. Ltd.; 1975, 144p.

Sterne M, Warrack GH. The types of *Clostridium perfringens*. **J Pathol Bacteriol.** 1964; 88: 279-83.

Stringer MF, Watson GN, Gilbert RJ. *Clostridium perfringens* Type A: serological typing and methods for the detection of enterotoxin. In: Corry, J.E.L.; Roberts, D.; Skinner, F.A. Isolation and identification methods for food poisoning organisms. **Academic Press (Soc Appl Bact Tech)** 1982; 17: 111-135.

Stron A, Dyer JK, Marsh C, Tribble JL. Identification and characterization of species of the family *Bacteroidaceae* by polyacrylamide gel electrophoresis. **J Dental Res.** 1976; 35: 252-256.

Sturion MAT, Paranzini CS, Gusman CR, Cunha LFCF, Viotti NMA, Silva LC, Okano W. Mastite Gangrenosa por *C. perfringens* em vacas holandesas. Relato de caso **In: Anais IV Encontro de Atividades científicas da UNOPAR.** Araçatuba 2001.

Swartz MN. Anaerobic spore-forming bacilli. In: Davis, B.D. et al. **Microbiology.** J.B. Lippincott Co. Philadelphia 1990; p. 633-45.

Swindlehurst CA, Shan HN, Parr CW, Willians RAD. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of polipeptides from *Bacteroides melaninogenicus*. **J Appl Bacteriol.** 1977; 43: 319-324.

Tórtora JCO, Costa GA. The suitability of Tórtora's medium for the production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strains. **Microbiol Immunol.** 1985; 29: 509-516.

Urbano T, Iturrino RPS, Tremiliosi GN, Mourinõ JLP. Infecção de frangos de corte com *Clostridium perfringens*: reisolamento e teste de eficiência de promotores de crescimento *in vivo*. **In: Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.** Bauru (SP) 2001; 111.

Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, O'boyle D, Kelly WR. Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. **Letters in Applied Microbiology**. 1996; 23: 13-17.

Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, Kelly WR. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in feces of goats. **Letters in Applied Microbiology**. 1997; 25: 339-344.

Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Assis RA. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. **J Comp Pathol**. 2002; 126(1): 71-75.

Walker PD. Clostridium. In. Carter GR, Cole Jr. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. San Diego. Academic Press Inc. 1990; p. 220-51.

Warrack GH. Some observations on the typing of *Clostridium perfringens*. **Bull Off Int Epiz**. 1963; 59: 1393-400.

Warren AL, Uzal FA, Blackall LL, Kelly WR. PCR detection of *Clostridium perfringens* type D in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of goats and sheep. **Letters in Applied Microbiology**. 1999; 29: 15-19.

Welch WH, Nuttall GHF. A gas-producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood-vessels after death. **Bull John Hopkins Hosp.** 1892; 3: 81-91.

Willis AT. Clostridia of wound infection. **Butterworth.** 1969; 41-156.

Wilsdon MJ. Observations on the classification of *Bacillus welchii*. **Univ Cambridge Inst Anim Pathol Rep.** 1931; 8: 53-85.

Wilsdon MJ. The relationship of *Bacillus ovitoxicus* (Bennetts) to the *Clostridium welchii* group. **Univ Cambridge Inst Anim Pathol Rep.** 1932-33; 3: 46-51.

Whittan TS, Ochman H, Selander RK. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci. USA** 1983; 80: 1751-1755.

Winterfield RW, Berkhoff GA. Ulcerative enteritis in robins. **Avian Dis.** 1977; 21(2): 327-329.

Zeissler L, Rassfeld-Sternberg L. Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. **Br Med J** 1949; 1: 267.

ANEXOS

MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES

1. Meio de Carne Cozida (MCC)

Fígado bovino.....500g

Água destilada.....1.000mL

A carne empregada era devidamente limpa, livre de aponevroses e gorduras, adicionava-se o volume correspondente de água destilada. Essa mistura era levada ao cozimento em vapor fluente por 30 minutos. Após fervura a mesma era mantida por 12 horas em geladeira, a carne depois de resfriada era picada em pequenos cubos de 1cm x 1cm e a água era filtrada em papel filtro o que constituía a água de carne.

Caldo Simples

Água de carne.....1.000mL

Peptona (Difco).....10g

Cloreto de Sódio (Casas Americanas Limitada).....5g

Após completa dissolução dos componentes na água de carne, o pH era ajustado entre 7,4 e 7,6. O caldo era novamente filtrado para clarificação em papel filtro e um volume de 10mL era distribuído em tubos de 18x180mm contendo um cubo de carne e aproximadamente 1mL de vaselina sólida fundida. Os tubos eram devidamente fechados e submetidos a autoclavação por 120°C por 15 minutos.

2. Caldo Triptose e Extrato de levedura (CTE)

"Triptic soy Broth" (Sigma).....	15g
Extrato de levedura (Merck).....	5g
Água destilada.....	1.000mL

A mistura era dissolvida em agitador e após sua completa dissolução o pH era ajustado entre 7,2 e 7,4. Um volume de 10mL era distribuído em tubos de 18x180mm e um volume de 90mL em frascos, sendo ambos submetidos a autoclavação a 120°C por 15 minutos.

3. Ágar Gema de Ovo

BHI (Brain Heart Infusion Ágar, Difco).....	13g
Água destilada.....	250mL

O Ágar era dissolvido em banho fervente e a seguir esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após a esterilização o meio era resfriado a aproximadamente 50°C e adicionado de 10% de emulsão de gema de ovo a 50% e após ser homogeneizado era distribuído assepticamente em placas de Petri devidamente estéreis com um volume de 15mL. As placas eram mantidas no fluxo laminar abertas até completa solidificação e só então eram guardadas em geladeira.

Emulsão de gema de ovo a 50%

Gema de ovo.....	20mL
Água destilada.....	20mL

Um ovo de galinha preferencialmente de criação caseira era lavado com água e sabão e a seguir mantido por 1 hora em álcool etílico 70%. Após esse período o ovo era quebrado assepticamente, a gema filtrada em gaze estéril para remoção da película e colocada em cálice graduado estéril e o volume dobrado com água destilada estéril. Com o auxílio do bastão de vidro a mistura era então emulsificada.

4. Ágar Sangue de Carneiro 5%

Blood Ágar (Oxoid).....20g
Água destilada.....500mL

A base era devidamente dissolvida em banho fervente e após completa dissolução submetida à autoclave 120°C por 15 minutos. Após esterilização a base era resfriada a aproximadamente 50°C e assepticamente adicionada de 5% de sangue desfibrinado e estéril de carneiro, homogeneizado e distribuído em volume de 15mL em placas de Petri estéreis que eram mantidas no fluxo laminar abertas até completa solidificação e só então eram guardadas em geladeira.

5. Tampão Tris-glicina 60 mM pH 8,2 (para extração)

Tris

Tris.....7,26g
Água destilada.....1000ml

Glicina

Glicina.....4,50g
Água destilada.....1000ml

Verificar o pH das duas soluções e depois ir adicionando a solução de tris sobre a solução de glicina até obter o pH 8.2.

6. Tampão Tris-glicina 0,1M pH 8,2 (para corrida)

Tris

Tris.....12,11g
 Água destilada.....1.000mL

Glicina

Glicina.....7,50g
 Água destilada.....1.000mL

Verificar o pH das duas soluções e depois ir adicionando a solução de tris sobre a solução de glicina até obter o pH 8.2.

7. Tampão Fosfato 0,1M pH 6,5

NaH_2PO_4 (monobásico).....13g
 Água destilada.....1.000mL

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (anidro).....35,81g
 Água destilada.....1.000mL

Verificar o pH de ambas as soluções, separar 500mL do NaH_2PO_4 em um béquer e ir adicionando aos poucos $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ até obter pH 6,5.

8. Gel de poliacrilamida 7%

Acrilamida (AA- Inlab).....	6,65g
Bisacrilamida (BIS- Research Organics).....	0,35g
Persulfato de amônio 2% (Synth).....	2,8mL
Temed (N, N, N, N tetramethyl-ethylenediamine).....	0,1mL
Tampão Tris-glicina pH 8,2.....	100mL

Pesar a AA/BIS usando máscara e luvas, dissolver em 100mL de Tampão Tris-glicina pH 8,2 e 0,1M. Filtrar em gaze adicionar o Persulfato de amônio homogeneizar e adicionar o catalisador (Temed) agitar e rapidamente colocar na placa molde.

9. Coloração do Gel modificada (BACH 1991)

Fast red (Sigma).....	0,05mg
Tampão Fosfato 0,1M pH6,5.....	100mL
Solução 1% de α -naphthyl acetato.....	2mL

(Dissolvido 0,05g do naphthyl em 5mL sendo: 2,5mL de água destilada e 2,5mL de acetona)

10. Meio para fermentação do leite

Leite desnatado.....	20g
Água destilada.....	200mL

Dissolver o leite na água destilada, distribuir 5mL em tubos de 16x160mm e autoclavar à 100°C por 30 minutos.

11. Meio para fermentação de carboidratos (série bioquímica)**Peptona e Extrato de levedura pH 6,9 (PY)**

Peptona.....	1g
Yeast extract.....	1g
Solução de rezazurina.....	0,40mL
Água destilada.....	100mL
Solução de sais.....	4mL

Para cada 100mL de PY pesar:

Glicose.....	1g
Maltose.....	1g
Sacarose.....	1g
Lactose.....	1g

Autoclavar a 120°C por 10 minutos não ultrapassando esse tempo. Distribuir 3mL em tubos de 12x120mm estéreis e acondicionar em geladeira.