

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

GENOTIPAGEM DE *Clostridium perfringens* ISOLADOS
DE BEZERROS DE CORTE COM DIARRÉIA NEONATAL

Marina de Castro Ferrarezi

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

GENOTIPAGEM DE *Clostridium perfringens* ISOLADOS
DE BEZERROS DE CORTE COM DIARRÉIA NEONATAL

Marina de Castro Ferrarezi
Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia - Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

ARAÇATUBA - SP

2008

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve ao meu lado para guiar meus passos e me conceder sabedoria, perseverança e proteção para o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, por sua confiança em meu trabalho, oportunidade e por valiosa colaboração e amizade.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Marta, meus irmãos Guilherme e Claudia, por tanto carinho, dedicação, confiança e amor incondicional.

À Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso, por ceder seu laboratório e passar com tanta dedicação e atenção seus conhecimentos além da adorável convivência e amizade.

À Rosa Maria Ferreira Moraes, por tanta amizade e ensinamentos passados com paciência, dedicação, e sinceridade.

Ao Marcelo Alvim Soares, por seu amor, dedicação, por toda ajuda nas coletas e paciência com os finais de semana e feriados que passei no laboratório.

Aos meus queridos avós Joaquim e Yvone por toda atenção, amor e carinho.

Ao Prof. e pesquisador Glenn Songer por toda orientação, conselhos e interesse em meu trabalho.

Aos pesquisadores Mariano Miyakawa e prof. Dr. Francisco Uzal por me ajudarem com seus ensinamentos no planejamento e desenvolvimento do meu projeto.

À Fabiana Lara Castor da Nóbrega, por orientar meus passos com amizade e paciência sempre.

À Vera C. L. M. Curci, por sua amizade sincera, companheirismo e força nos momentos difíceis.

Ao Adão e Pedro, que estavam sempre prontos em ajudar nas coletas de sangue, momentos cansativos, mas muito divertidos.

À Profa. Sílvia Helena Venturolli Perri, por ajudar na realização das análises estatísticas e sugestões.

À Isabel Pereira Matos, Fátima e Alexandra – Unesp - Campus de Araçatuba, por toda colaboração, paciência, presteza e dedicação.

Aos colegas do mestrado: Marissol, Anivaldo, Leandro, Rodrigo, Denise, Dayana, Adriana, Rafael e Fabrine por toda amizade sincera, adorável convívio e todas as risadas que muito ajudaram nas tardes quentes de Araçatuba.

Aos estagiários, Tatiana, Otávio, Bruna e Talita, por me ajudarem com tanta dedicação e carinho nas tarefas do laboratório.

À Gilmara e ao Alexandre por uma convivência amigável e colaboração nos laboratórios.

Aos funcionários e proprietários das fazendas pela confiança, receptibilidade e ajuda permitindo que o experimento fosse realizado com seus animais.

Às minhas amigas Roberta e Lea, e às minhas primas Vívian e Priscila por sempre me incentivarem a continuar nos estudos e por permanecerem ao meu lado nos momentos de alegria e desânimo com sincera amizade e carinho.

À Biogénesis-Bagó por conceder minha bolsa de estudo que muito me ajudou e incentivou na realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financiador do meu projeto.

À Universidade Estadual Paulista, pela viabilidade da realização do mestrado.

SUMÁRIO

	Página
I INTRODUÇÃO	9
II REVISÃO DE LITERATURA	10
III MATERIAL E MÉTODOS	17
1 Local de realização do experimento	17
2 Amostras de fezes de bezerros de corte	17
3 Cultivo e isolamento	17
4 Extração do DNA	18
5 Oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	19
6 PCR multiplex	20
IV RESULTADOS	21
V DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICES	31
A. Meio de tioglicolato	32
B. Meio de agar sangue	34
C. Meio seletivo para <i>Clostridium perfringens</i>	36
D. Meio de infusão cérebro e coração	39

GENOTIPAGEM DE *Clostridium perfringens* ISOLADOS DE BEZERROS DE CORTE COM DIARRÉIA NEONATAL

RESUMO.- A diarreia neonatal é uma das principais causas de perdas na bovinocultura. O *Clostridium perfringens* é um enteropatógeno amplamente distribuído na natureza e responsável por várias doenças nos animais, dentre elas a diarreia neonatal. Foram examinadas 141 amostras fecais de bezerros com diarreia e 129 amostras de animais saudáveis, com até 28 dias de idade e pertencentes a três rebanhos distintos. Do cultivo bacteriológico em anaerobiose foi possível isolar 36,2% e 30,2% amostras suspeitas de *Clostridium perfringens* dos animais enfermos e dos animais saudáveis, respectivamente. A genotipagem bacteriana foi efetuada empregando-se a técnica de PCR multiplex com os *primers* dos genes codificadores das toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*), épsilon (*etx*), iota (*itxA*), enterotoxina (*cpe*) e toxina beta2 (*cpb2*). Dentre as amostras isoladas, 17/51 (33,3%) e 17/39 (43,6%) dos animais com diarreia e saudáveis, respectivamente, amplificaram um ou mais genes codificadores das toxinas de *C. perfringens*. Dos bezerros com diarreia, quatorze apresentaram somente o gene *cpa* (tipo A), um apresentou o *cpa* e *cpb2* (tipo A beta2 positivo), um amplificou o *cpa*, *itxA*, e *cpb2* (tipo E, beta2 positivo) e um amplificou o *cpa*, *etx*, *itxA* e *cpb2* (tipo D e E, um ou ambos *cpb2* positivo). Dentre os bezerros saudáveis, 10 eram exclusivamente tipo A, um era tipo A *cpb2* positivo, dois eram tipo E, três eram tipo E *cpb2* positivo e um era tipo D e E *cpb2* positivo. Não houve correlação entre a genotipagem dos genes codificadores das toxinas de *Clostridium perfringens* e a presença de diarreia neonatal nos bezerros.

Palavras-chave: Bezerros, *Clostridium perfringens*, diarreia neonatal, PCR

GENOTYPING OF *Clostridium perfringens* ISOLATED FROM CALVES WITH NEONATAL DIARRHEA

SUMMARY- Neonatal diarrhea is one of the main causes of losses in cattle herds. *Clostridium perfringens* is a widespread enteropathogen, and is responsible for many animal diseases such as bovine neonatal diarrhea. Fecal samples from 141 diarrheic calves and 129 healthy calves, aged up to 28 days and belonging to three herds were examined. Rates of culture positivity were 36.2% and 30.2% for diarrheic and nondiarrheic calves, respectively. Multiple isolates from primary isolation plates were subjected to simultaneous genotyping by multiplex PCR, with primers amplifying fragments of alpha (*cpa*), beta (*cpb*), epsilon (*etx*), iota (*itxA*), enterotoxin (*cpe*) and beta2 (*cpb2*) toxin-encoding genes. Only 17/51 (33.3%) and 17/39 (43.6%) of these mixtures from diarrheic and nondiarrheic calves, respectively, yielded genotype information, suggesting that this may not be a viable approach to genotyping of isolates. Fourteen isolate mixtures from animals with diarrhea had only *cpa* (type A), one had *cpa* and *cpb2* (type A beta2 positive), one with *cpa*, *itxA*, and *cpb2* (type E, beta2 positive), and one with *cpa*, *etx*, *itxA*, and *cpb2* (Types D and E, one or both *cpb2* positive). Among 17 isolate mixtures from healthy calves, 10 were exclusively type A, one was type A *cpb2* positive, two were type E, three were type E *cpb2* positive, and one was types D and E *cpb2* positive. There was no correlation between isolation of a given toxin type and the presence of diarrhea.

Keywords: Calves, *Clostridium perfringens*, neonatal diarrhea, PCR

I INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte no Brasil tem significado econômico e social expressivo. Dentre os problemas sanitários dos bovinos de corte a diarreia neonatal é uma das principais causas de morbidade. Reconhecida como síndrome, a doença decorre da interação entre fatores como a imunidade do bezerro, o ambiente, a nutrição e a ocorrência de infecções por diferentes microrganismos com potencial patogênico.

O *Clostridium perfringens* tem sido descrito como uma das principais causas de diarreias em humanos e nos animais. Pode ser habitante natural do trato gastrintestinal e sob condições favoráveis produzir diversas toxinas e enzimas responsáveis por sérias lesões. As toxinas produzidas com maior importância são a alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX), e iota (ITXA e ITXB) estas são utilizadas para a tipificação do microrganismo entre os tipos A, B, C, D e E.

A determinação dos tipos de *C. perfringens* tem uma importância particular para a identificação bacteriana e em estudos de prevalência de cepas toxinogênicas. Com isso, é possível realizar diagnósticos mais precisos e assim utilizá-los no desenvolvimento de medidas eficazes de prevenção, incluindo o uso da vacinação com toxóides adequados.

O método clássico de tipificação é baseado no teste de neutralização das toxinas com anti-soro homólogo, em camundongos. Este procedimento requer um longo tempo para obter os resultados, utiliza animais como modelos biológicos e é caro, pois necessita de anti-soro para cada tipo de toxina. A tipificação do *C. perfringens* pode ser realizada pelo método de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) que é reconhecido como mais rápido e seguro para a detecção dos genes que codificam as toxinas, além de ser consideravelmente mais barato, e assim, o mais indicado para uso na rotina laboratorial.

Apesar dos prejuízos desencadeados pela diarreia na pecuária bovina de corte, são escassos os estudos no Brasil que enfocam a identificação dos principais enteropatógenos em bezerros de corte, criados extensivamente.

A participação do *Clostridium perfringens* é sempre mencionada e reconhecida, fazendo parte inclusive das vacinas comerciais, porém inexistente informação na literatura brasileira sobre o real significado ou mesmo a sua participação na diarreia neonatal em bovinos de corte no país.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo identificar pela técnica de reação em cadeia pela polimerase com múltiplos *primers* (PCR multiplex) os tipos de *Clostridium perfringens* presentes em fezes de bezerros de corte com até 28 dias de idade, obtidas de animais com e sem diarreia e criados extensivamente.

II REVISÃO DE LITERATURA

A bovinocultura de corte no Brasil tem significado econômico e social expressivo. Na atualidade o país é detentor do maior rebanho comercial mundial e maior exportador de carne bovina, comercializando produtos em 180 países (ABIEC, 2007).

A criação de bovinos tem importante participação na economia nacional e no agronegócio. O rebanho brasileiro de corte possui, aproximadamente, 94 milhões de matrizes com uma produção anual de 44,6 milhões de bezerros (ANUALPEC, 2006).

Os bezerros ocupam posição especial na cadeia de produção, devendo-se ressaltar que o manejo neonatal a que forem submetidos terá reflexos sobre a sua vida produtiva, influenciando o seu futuro desempenho como fonte de carne ou leite.

A eficiência de um sistema de produção depende, além de outros parâmetros produtivos, de uma alta taxa de sobrevivência dos neonatos, tendo em vista que este fator reflete diretamente na rentabilidade do sistema de produção.

A taxa de mortalidade neonatal é muito variável acometendo de seis a 50% do total de recém nascidos (BLOOD; RADOSTITS, 1991), porém inexistem dados precisos sobre o coeficiente de mortalidade de bezerros no Brasil.

Dentre os problemas sanitários dos bovinos de corte a diarreia neonatal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade e é responsável por causar perdas econômicas significativas (COETZER et al., 1994).

Reconhecida como síndrome, a diarreia neonatal bovina decorre da interação entre fatores como a imunidade do bezerro, o ambiente, a nutrição e a ocorrência de infecções por diferentes microrganismos com potencial patogênico.

Um termo comumente empregado para relatar a ocorrência da enfermidade seria diarreia aguda indiferenciada (DAI), visto que através da observação clínica não é possível realizar um diagnóstico etiológico definitivo (SCHUCH, 2001).

A síndrome acarreta um atraso no desenvolvimento e até a morte dos animais, além de gastos com medicamentos e tratamentos (LEMOS; COELHO, 1998).

A enfermidade caracteriza-se, clinicamente, por diarreia aquosa aguda e profusa, que ocasiona uma grande perda de líquidos e eletrólitos corporais, levando à desidratação progressiva, acidose, podendo evoluir para um choque hipovolêmico e morte (SCHUCH, 2001).

A etiologia das diarreias em bezerros é complexa e envolve fatores predisponentes, aspectos físicos e nutricionais, o manejo sanitário, a higiene e densidade dos criatórios, a condição sanitária das mães e a interação entre agentes infecciosos como vírus, bactérias e toxinas bacterianas, protozoários e parasitas (BENESI, 1999, BLOOD; RADOSTITS, 1991).

O *Clostridium perfringens* tem sido descrito como uma das principais causas de diarreias em humanos e nos animais domésticos (ODENDAAL, 1994), muito embora todos os possíveis efeitos sinérgicos entre as toxinas não estão totalmente esclarecidos na sua etiopatogenia.

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos anaeróbios, formadores de esporos e produtores de toxinas que se encontram ubiqüitariamente distribuídos, podendo ser encontrados no solo, água, pastagens, alimentos de origem animal e vegetal, trato gastrintestinal do homem e demais espécies animais (ODENDAAL, 1994).

As condições nutricionais favoráveis e a anaerobiose presentes no trato intestinal dos mamíferos são atrativas a diversas espécies de clostrídios (ROOD et al., 1997).

O *Clostridium perfringens* é um importante representante desse gênero e sob condições favoráveis pode se proliferar e produzir diferentes toxinas e enzimas hidrolíticas que causam diversas enfermidades entéricas e sistêmicas em animais e no homem (ROOD et al., 1997).

Esses microrganismos diferem-se dos demais clostrídios por se apresentarem como bacilos relativamente espessos (0,6-2,4 X 1,3-9,0 µm), são encapsulados e imóveis. As colônias são brancas, redondas, resplandecentes, circundadas por um halo completo de hemólise provocado pela toxina theta e um outro halo incompleto de hemólise é formado pela presença da toxina alfa (QUINN et al., 1994).

O microrganismo pode sobreviver em condições extremas por diferenciar-se da forma vegetativa para um formato extremamente resistente de endosporos latentes (QUINN et al., 1994).

Segundo Rood et al. (1997) o *Clostridium perfringens* é responsável pela síntese de cerca de quinze (15) tipos de toxinas e diversas enzimas, dentre as quais quatro possuem maior importância (alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX), e iota (ITXA e ITXB)) e são utilizadas para a tipificação das bactérias entre os tipos A, B, C, D e E (ODENDAAL, 1994; PETIT et al., 1999).

Duas outras toxinas (enterotoxina e toxina beta 2) também podem ser produzidas pelo *C. perfringens*, embora elas não sejam utilizadas para sua tipificação (GIBERT et al., 1997; ODENDAAL, 1994).

Alguns tipos de *C. perfringens*, como o tipo A, são comumente encontrados tanto no trato intestinal dos animais como no meio ambiente,

enquanto os outros tipos (B, C, D, e E) são ocasionalmente encontrados nas mesmas condições (CARTER; CHENGAPPA, 1991; NILO, 1980).

Como o *Clostridium perfringens* pode ser isolado do conteúdo intestinal tanto de animais sadios como também daqueles com diarreia, a simples detecção desta bactéria não a caracteriza como causadora de doença (SIPOS et al., 2003).

A virulência do microrganismo é devido à sua habilidade de produzir uma ou mais toxinas e enzimas hidrolíticas que se diferenciam na potência de toxicidade e são as responsáveis pelas lesões e sintomas associados, visto que a bactéria não invade as células normais do organismo (PETIT et al., 1999; SIPOS et al., 2003).

Todas as toxinas e enzimas hidrolíticas produzidas são secretadas durante a fase de crescimento exponencial da bactéria, com exceção da enterotoxina que é liberada após sua lise, e são associadas a uma doença em particular, quer seja humana ou animal (PETIT et al., 1999).

Com exceção da toxina iota, que age intracelularmente, as demais toxinas do *C. perfringens* interagem com a membrana celular, provocando uma ruptura ou a formação de poros que acarretarão em alterações na permeabilidade da mesma (PETIT et al., 1999).

A toxina alfa é uma fosfolipase C comumente produzida por todos os cinco tipos de *C. perfringens*, e predominante no tipo A, sendo responsável por desencadear hemólises nas membranas fosfolipídicas dos eritrócitos, plaquetas, leucócitos e de células endoteliais e musculares, resultando em lises (SONGER, 1996). É hemolítica, dermonecrótica, necrotizante e potencialmente letal. Os principais efeitos letais associados a essa toxina são as gangrenas gasosas nos humanos e as enterites necróticas e enterotoxemias nos animais (HATHEWAY, 1990).

A toxina beta é uma proteína altamente sensível à ação da tripsina (SAKURAI; DUNCAN, 1977). Produzida pelas cepas dos tipos B e C de *C. perfringens*, é composta por uma cadeia simples de polipeptídeo de aproximadamente 40 kDa. Esta é responsável por provocar necroses nas

mucosas e por agir no sistema nervoso central (HUNTER et al., 1993). Está associada aos casos de enterites necróticas nos humanos e enterotoxemias nos animais (SONGER, 1996).

Os estudos realizados por Gibert et al. (1997) relataram a presença da beta2, uma nova toxina isolada de cepas de *C. perfringens* (tipo C) de leitões com enterites necróticas. Segundo Petit et al. (1999) a toxina beta2 também pode ser produzida por algumas cepas de *C. perfringens* tipo A. Ela é necrotizante, possui 15% de identidade genética e um pequeno nível de reação imunológica cruzada com a já conhecida toxina beta (PETIT et al., 1999).

A toxina épsilon, é uma proteína com peso molecular de 33 kDa. Sintetizada e secretada como uma prototoxina produzida pelos tipos B e D de *C. perfringens*, é necrotizante e letal, sendo responsável por uma enterotoxemia severa e fatal nos animais que acarreta grandes prejuízos econômicos (HATHEWAY, 1990; ODENDAAL, 1994).

A toxina iota está presente somente no tipo E, também é produzida e secretada como uma prototoxina. É constituída por dois componentes, ou seja, duas proteínas independentes, que são: um componente ligante (Ib) e um componente enzimático (Ia). Ambos são necessários para a eficaz ação deletéria da toxina. O componente Ib é responsável por reconhecer o receptor específico na superfície da membrana celular, e assim, os dois componentes da toxina são internalizados na célula, com isso, a fração Ia pode entrar em ação provocando uma desordem no citoesqueleto de actina celular (PETIT et al., 1999). Essa toxina provoca um aumento na permeabilidade vascular, é dermonecrótica e letal (CRAIG; MILES, 1961), também está associada aos casos de enterotoxemia em bezerros e cabritos (HATHEWAY, 1990).

Além das toxinas denominadas principais, existem outras também produzidas por cepas de *C. perfringens* as quais podem ter participação em várias doenças, como por exemplo a enterotoxina produzida pelas cepas de *C. perfringens* tipo A, que tem grande importância nas diarreias humanas e dos animais (ODENDAAL, 1994).

A determinação dos tipos de *C. perfringens* tem uma importância particular para a identificação bacteriana e em estudos de prevalência de cepas toxinogênicas (AUGUSTYNOWICZ et al., 2000). Com a correta identificação dos tipos é possível realizar diagnósticos mais precisos para patologias associadas (PETIT et al., 1999).

Os estudos e levantamentos epidemiológicos também são dependentes de uma eficaz identificação dos tipos de *C. perfringens*, assim podem ser utilizados no desenvolvimento de medidas eficazes de prevenção, incluindo o uso da vacinação mais adequada (PETIT et al., 1999; ROOD et al., 1997).

A avaliação e conhecimento dos tipos de *C. perfringens* presentes em uma população animal é essencial para que os toxóides apropriados sejam corretamente incluídos nas vacinas utilizadas na área.

O método clássico de tipificação, utilizados desde 1931, é baseado no teste de letalidade em camundongos associado a uma soroproteção com anticorpos neutralizantes homólogos a cada tipo de toxina do *C. perfringens* provenientes do sobrenadante de culturas puras da bactéria (PETIT et al., 1999). Este teste *in vivo* de neutralização das toxinas em camundongos só pode ser realizado após o crescimento e isolamento de culturas do microrganismo (CARTER; COLE JUNIOR, 1990).

O procedimento apresenta várias desvantagens uma vez que requer um longo tempo para obter os resultados, utiliza animais como modelo biológico e é caro pois necessita de anti-soro para cada tipo de toxina, os quais não estão mais disponíveis comercialmente. Além disso, algumas cepas podem não produzir toxinas sob as condições laboratoriais, o que torna a identificação pelo teste de neutralização em camundongos impossível de ser realizado (McDONEL, 1986).

Um método alternativo de tipificação consiste em realizar uma injeção intradérmica do sobrenadante de culturas puras de *C. perfringens* em cobaias, o que causa uma necrose característica e lesão eritematosa. Porém, apresenta as mesmas desvantagens do teste de neutralização *in vivo*: indisponibilidade

comercial de anti-soro pra cada tipo de toxina, uso de animais, além da impossibilidade de tipificação das novas toxinas (PETIT et al., 1999).

Além dos métodos microbiológicos, a tipificação do *C. perfringens* pode ser realizada pela detecção de algumas de suas toxinas, nas fezes, por métodos imunológicos, com a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (MOLLER; AHRENS, 1996).

Muito embora o teste de ELISA seja capaz de realizar a tipificação do *C. perfringens*, as opções para subtipagens ficam limitadas, uma vez que o teste não detecta toxinas como a beta2 (BAUMS et al., 2004). Além disso, níveis elevados de enterotoxina parecem estar presentes apenas durante a esporulação, dificultando sua detecção pelo ELISA (BAUMS et al., 2004).

Moller e Ahrens (1996) compararam a eficácia do teste de ELISA e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do gene codificador da toxina beta, em culturas puras e mistas, isoladas de suínos que morreram devido a uma enterite necrótica. Concluíram que o teste de PCR foi superior na detecção do gene codificador da toxina beta diretamente da mucosa intestinal necrosada, além de ter sido realizado em poucas horas.

O método de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido aplicado em várias áreas desde o final dos anos 80. Quando comparado ao teste de neutralização de toxinas em camundongos, é reconhecido como mais rápido e seguro para a detecção dos genes que codificam as toxinas (DAUBE et al., 1994; UZAL et al., 1996; YOO et al., 1997).

A sensibilidade e especificidade do método foram confirmadas e validadas, pois ocorre uma amplificação de porções específicas dos genes que codificam as principais toxinas produzidas pelos cinco tipos de *Clostridium perfringens*, sob condições pré-determinadas (DAUBE et al., 1994).

O diagnóstico pela PCR também é consideravelmente mais barato que o teste de neutralização de toxinas em camundongos, sendo assim o mais indicado para uso na rotina laboratorial (BUOGO et al., 1995).

Outra vantagem da PCR é que este não depende da esporulação *in vitro* dos clostrídios, reduzindo assim, significativamente, os resultados falso-negativos (SONGER, 1996).

III MATERIAL E MÉTODOS

1 Local de realização do experimento

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Enfermidades Infecciosas causadas por Anaeróbios da Unesp, Araçatuba, SP, Curso de Medicina Veterinária.

2 Amostras de fezes de bezerros de corte

Foram coletadas utilizando-se de “swabs” retais e mantidos em meio de transporte Stuart (Swabs Transbac-Stuart, DME[®]), 270 amostras do conteúdo intestinal (fezes) de bezerros de ambos os sexos, sadios (129 amostras) e com sinais de diarreia (141 amostras), criados em sistema extensivo, com até 28 dias de idade. As amostras de fezes foram transportadas e mantidas sob refrigeração, até o seu processamento no laboratório.

Os bezerros estudados foram oriundos de três propriedades rurais de corte localizadas nos municípios de Brasilândia (MS), Cardoso (SP) e Lavínia (SP), que possuíam um sistema de escrituração zootécnica e assistência técnica que possibilitou a realização do trabalho.

3 Cultivo e isolamento

As amostras de fezes foram cultivadas em meio líquido de Tioglicolato (Caldo Tioglicolato, OXOID[®]), para o enriquecimento bacteriano, por 24 horas à temperatura de 37°C, em jarras de anaerobiose (Anaerogen, 2,5L, OXOID[®]). Após esta etapa, o crescimento bacteriano total foi plaqueado em ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado, de acordo com Miserez et al., 1998; Sipos et al., 2003. A partir do crescimento em agar sangue, as colônias suspeitas foram repicadas em meio de cultura seletivo para *C.*

perfringens (Perfringens Agar Base SFP, OXOID[®]) e assim incubadas em anaerobiose a 37°C por 24 horas.

As colônias suspeitas pela caracterização fenotípica presuntiva de *C. perfringens*, ou seja, as que apresentavam duplo halo de hemólise no crescimento em agar sangue, cor branca perolada e que apresentavam-se como bacilos Gram-positivos, foram mantidas armazenadas em meio BHI (Brain Heart Infusion – BHI, HIMEDIA[®]) (PIATTI et al., 2004) à temperatura de -20°C.

As amostras de culturas puras ATCC 13124 e ATCC 12924 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos, RJ) e utilizadas como controle positivo para a reação de PCR multiplex.

4 Extração do DNA

Para a realização da extração do DNA das amostras isoladas, foram transferidos 300 µL da suspensão, correspondente ao meio de armazenamento em BHI contendo as colônias suspeitas, para tubos livres de DNA e RNA, devidamente autoclavados. Estes foram vedados e tiveram suas tampas perfuradas por agulha estéril 16 x 40 mm.

A técnica de extração de DNA utilizada foi pela irradiação térmica por microondas, segundo Valsecchi (1998), com algumas modificações.

Deste modo, os tubos foram submetidos à fervura em microondas na potência de 30 W, em ciclos de 30 segundos, até completar 8 minutos. Em seguida, os mesmos foram centrifugados por 2 minutos (13000 x *g*) e as amostras precipitadas com 1 mL de etanol absoluto (100%) por 3 horas, a -86° C. Após esta etapa, as mesmas foram centrifugadas por 10 minutos (13000 x *g*) e o sedimento de DNA formado no fundo do tubo foi dissolvido com adição de 50 µL de Água Ultrapura (Ultra Pure Distilled Water, DNase, RNase Free, Invitrogen[®]) e, posteriormente, aquecido a 56° C, em banho Maria, por 20 minutos para evaporação do etanol residual. Para a PCR foram utilizados 5

µL do sobrenadante de DNA extraído, como molde, após o aquecimento (56°C por 30 minutos), procedimento este que se repetiu ao longo das análises.

5 Oligonucleotídeos (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a reação de PCR foram sintetizados (Invitrogen®) para regiões específicas de cada um dos genes codificadores das toxinas pesquisadas, segundo Songer e Bueschel (1999) (Tabela 1).

Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes codificadores das principais toxinas de *Clostridium perfringens* utilizados na reação de PCR multiplex.

<i>primers</i> das Toxinas	Tamanho do fragmento (pb)	Seqüência de <i>primers</i>	Tipos de <i>C. perfringens</i>
<i>cpa</i> (toxina alpha)	324 pb	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	A, B, C, D e E
<i>cpb</i> (toxina beta)	196 pb	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	B e C
<i>Cpe</i> (toxina épsilon)	233 pb	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	B e D
<i>iA</i> (toxina iota)	446 pb	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	E
<i>EtX</i> (enterotoxina)	655 pb	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCTACTAAC	A
<i>Cpb2</i> (toxina beta2)	567 pb	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC	-

Segundo Songer e Bueschel (1999).

Cada um dos *primers* foi individualmente diluído para a concentração de estoque de 100 pmol e, de cada um destes, 10 µL foram retirados adicionados em outro tubo, contendo 90µL de água DEPEC, na concentração de uso 10 pmol, e armazenados separadamente do tubo original em freezer separado.

6 PCR multiplex

O protocolo da PCR multiplex utilizado foi realizado segundo Songer e Bueschel (1999), com modificações.

Para cada reação de PCR multiplex foram empregadas as seguintes concentrações em um único mix: 25 μL do PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen[®], Cat. No. 10790-020), que continha 22 U/mL DNA polimerase em 66 mM Tris-SO₄ (pH 9,1 a 25° C), 19,8 mM (NH₄)₂SO₄, 2,2 mM MgSO₄, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP e adicionados 1 μL de cada um dos *primers*.

Para adequação da concentração MgSO₄ foram acrescentados 7 μL de 50mM MgSO₄ o que corresponde a uma concentração final de 7mM para cada reação realizada.

Para 50 μL de reação foram adicionados 44 μL dos reagentes (mix) da reação de PCR, 1 μL (5 UI) da enzima Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen[®], Cat. No. 11304-011) e, separadamente, 5 μL do sobrenadante de DNA de cada amostra (após centrifugação por 1 minuto a 13000 x *g*). Em seguida, esses tubos foram centrifugados (1 minuto a 13000 x *g*) e processados no Termociclador Mastercycler (Eppendorf[®]) nas seguintes condições: 1º ciclo à temperatura de 94° C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos (94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 68° C por 1 minuto) e um último ciclo à temperatura de 72° C por 10 minutos para extensão final. A temperatura da tampa ("lid") do Termociclador permaneceu fixa em 55° C durante todo o procedimento. Ao término do processo no termociclador, os tubos eram novamente centrifugados (1 minuto a 13000 x *g*) antes da eletroforese.

As amostras de culturas puras ATCC 13124 e ATCC 12924 foram utilizadas como controle positivo e água ultrapura, como negativo.

Para realização da eletroforese, 8 μL do produto amplificado foi adicionado a 2 μL de tampão de corrida (10X BlueJuice, Invitrogen[®], Cat. No. 10816-015) e 10 μL de água DEPEC e depositados no gel de agarose 1,2% (Ultra Pure Agarose, Gibco BRL[®], Cat. No. 15510-019) com 12 μL de brometo

de etídio.

A eletroforese foi realizada com 80 V, 200 mA por 70 minutos, na fonte “Eletrophoresis Power Supply” (EPS - 301). A visualização do gel foi realizada em um transiluminador (UVP – White/Ultraviolet Transiluminator[®]), fotografada com máquina fotográfica KD 290 (Kodak[®]) e o programa de digitalização utilizado foi o Adobe Photoshop[®].

O perfil eletroforético das amostras positivas foi então comparado com o peso molecular das amostras descritas pelos autores, e com os pesos moleculares padrão de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen[®], Cat. No. 10787-018) e 100pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen[®], Cat. No. 15628-019).

A análise estatística foi efetuada empregando-se o teste do qui-quadrado no programa SAS (Statistical Analysis System, 2002).

Todas as amostras suspeitas que não apresentaram nenhum dos genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* pesquisadas, foram genotipadas (pela mesma reação de PCR multiplex) novamente ao término do experimento.

IV RESULTADOS

Dentre as amostras genotipadas, 17/51 (33,3%) de bezerros com diarreia e 17/39 (43,6%) oriundas de bezerros sadios apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de um ou mais genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* pesquisadas na técnica de PCR multiplex (Tabela 2 e Figura 1).

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os animais com um ou mais genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* e a presença da diarreia ($p=0,7814$).

Tabela 2 - Número de bezerros neonatos com e sem diarreia que apresentaram amplificação de fragmentos de DNA de um ou mais genes codificadores das toxinas de *Clostridium perfringens* por meio da PCR multiplex

Diarréia	<i>Clostridium perfringens</i>		Total
	Presente (N, %)	Ausente (N, %)	
com diarreia	17 (12,06%)	124 (87,94%)	141 (100%)
sem diarreia	17 (13,18%)	112 (86,82%)	129 (100%)
Total	34 (12,59%)	236 (87,41%)	270 (100%)

P= 0,7814 pelo teste de Qui-quadrado (χ^2)

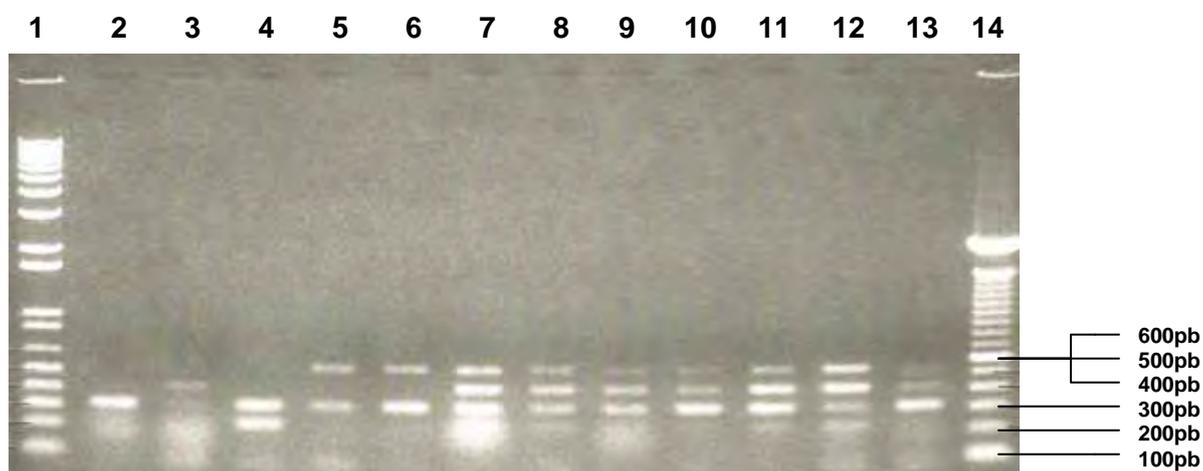


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de fragmentos de DNA amplificados por PCR multiplex, das amostras de *C. perfringens* isolados dos fezes dos bezerros neonatos (2 a 13)
 1- Padrão molecular de 1Kb (Invitrogen®)
 14- padrão molecular de 100 pb (Invitrogen®)

Dentre as 17 amostras que apresentaram um ou mais genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* nos bezerros com diarreia, 14 apresentaram somente o gene *cpa* (tipo A), um apresentou o *cpa* e *cpb2* (tipo A beta2 positivo), um amplificou o *cpa*, *itxA*, e *cpb2* (tipo E, beta2 positivo) e um amplificou o *cpa*, *etx*, *itxA* e *cpb2* (tipo D e E, um ou ambos *cpb2* positivo). Dos bezerros saudáveis, 10 eram exclusivamente tipo A, um era tipo A *cpb2* positivo,

dois eram tipo E, três eram tipo E *cpb2* positivo e um era tipo D e E *cpb2* positivo (Tabela 3).

Tabela 3 - Presença dos genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* isolados do conteúdo intestinal (fezes) de bezerros de corte com e sem diarreia neonatal

Animal	Diarreia	Genes Codificadores das Toxinas de <i>C. perfringens</i>						Tipo
		Alfa (<i>cpa</i>)	Beta (<i>cpb</i>)	Épsilon (<i>Cpe</i>)	Iota (<i>iA</i>)	Enterotoxina (<i>EtX</i>)	Beta2 (<i>Cpb2</i>)	
8	não	+	-	-	+	-	+	E, Beta2 positivo
13	não	+	-	-	-	-	-	A
17	não	+	-	+	+	-	+	D, E, Beta2 positivo
19	não	+	-	-	-	-	-	A
20	não	+	-	-	-	-	-	A
21	não	+	-	-	-	-	-	A
22	não	+	-	-	+	-	-	E
26	não	+	-	-	-	-	-	A
27	não	+	-	-	-	-	+	A, Beta2 positivo
47	não	+	-	-	-	-	-	A
63	não	+	-	-	+	-	+	E, Beta2 positivo
64	não	+	-	-	+	-	-	E
80	não	+	-	-	-	-	-	A
83	não	+	-	-	-	-	-	A
84	não	+	-	-	-	-	-	A
85	não	+	-	-	-	-	-	A
89	não	+	-	-	+	-	+	E, Beta2 positivo
5	sim	+	-	-	+	-	+	E, Beta2 positivo
10	sim	+	-	-	-	-	-	A
23	sim	+	-	-	-	-	-	A
24	sim	+	-	+	+	-	+	D, E, Beta2 positivo
25	sim	+	-	-	-	-	-	A
30	sim	+	-	-	-	-	-	A
32	sim	+	-	-	-	-	-	A
34	sim	+	-	-	-	-	+	A, Beta2 positivo
39	sim	+	-	-	-	-	-	A
40	sim	+	-	-	-	-	-	A
45	sim	+	-	-	-	-	-	A
46	sim	+	-	-	-	-	-	A
48	sim	+	-	-	-	-	-	A
52	sim	+	-	-	-	-	-	A
53	sim	+	-	-	-	-	-	A
81	sim	+	-	-	-	-	-	A
91	sim	+	-	-	-	-	-	A

V DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A diarreia neonatal é uma das principais causas de morbidade responsável por grandes perdas econômicas na criação de bezerros. Geralmente é de etiologia multifatorial, envolvendo fatores ambientais, genéticos e nutricionais, combinados com microrganismos patogênicos como o *Clostridium perfringens*.

O *Clostridium perfringens* é um dos patógenos que se encontra amplamente distribuído pela natureza (PIATTI et al., 2004; SONGER, 1996). As doenças causadas por este microrganismo têm importância econômica, na saúde pública e animal, geralmente com alta morbidade e curso fatal, muito embora o microrganismo faça parte da microflora intestinal normal dos homens e animais (ODENDAAL, 1994).

O método de prevenção mais eficaz contra as doenças causadas pelo *C. perfringens*, nos animais, é a vacinação. Sendo assim, é necessário que ocorra uma boa correspondência entre os toxóides utilizados nas vacinas comercializadas e os tipos isolados e genotipados das cepas de campo (PETIT et al., 1999).

Neste estudo, cerca de 30 - 36% dos bezerros, independente das condições clínicas, apresentaram colônias características de *C. perfringens*, por meio o isolamento microbiológico.

Com a genotipagem, por meio da técnica de PCR multiplex, dos tipos A, D e E (alguns beta2 positivos) de *Clostridium perfringens* presentes nas fezes de bezerros sadios e com diarreia comprova a participação do microrganismo como ubiqüitário no trato intestinal dos animais.

A amplificação do gene codificador da toxina alfa (*cpa*) foi observado em todas as amostras que apresentaram um ou mais genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* pesquisadas, tanto nos animais sadios quanto nos animais com diarreia, corroborando assim com a literatura existente (CARTER; CHENGAPPA, 1991; NILO, 1980).

Segundo Petit et al. (1999), devido a localização da maioria dos genes codificadores das toxinas de *C. perfringens* ser em locais extracromossomais (plasmídeos) poderiam aumentar as ocorrências de diversidades entre os tipos do microrganismo genotipados. Com isso, a perda ou a aquisição desses plasmídeos podem ser, ocasionalmente, responsáveis por mudanças observadas na tipificação de algumas cepas, após a realização de cultivos seriados durante o isolamento das mesmas.

Com a genotipagem pela técnica de PCR multiplex foi possível identificar os tipos A, D e E (alguns beta2 positivos) de *C. perfringens* presentes nas fezes de bezerros sadios e doentes. Informação esta de grande importância para os estudos e levantamentos epidemiológicos, bem como para o uso de toxóides apropriados nas vacinas e para o uso de métodos de controle e prevenção das doenças por estes provocadas (YOUHANNA et al., 2006).

O potencial enteropatogênico dessas cepas identificadas e a existência de condições predisponentes é o que determinará a ocorrência ou não dos problemas sanitários relacionados ao *Clostridium perfringens* no período neonatal (YOUHANNA et al., 2006), uma vez que o simples isolamento do microrganismo não o caracteriza como causador da diarreia.

Em concordância com outros autores (DAUBE et al., 1994; PIATTI et al., 2004; SONGER, 1996; UZAL et al., 1996; YOO et al., 1997), a técnica de PCR demonstrou ser uma alternativa eficiente na genotipagem de amostras fenotipicamente suspeitas de *C. perfringens*, apresentando vantagens como rapidez, sensibilidade e especificidade, além de dispensar o uso de animais como modelos biológicos e o de antitoxinas padrão de difícil obtenção. Assim, a técnica de PCR multiplex pode ser uma ferramenta eficiente para a rotina diagnóstica no laboratório.

Os resultados desse estudo comprovam a presença ubiqüitária dos tipos A, D e E (alguns beta2 positivos) de *C. perfringens* nas fezes de bezerros com e sem diarreia, com até 28 dias de idade e criados em sistemas extensivos de corte, indicadores epidemiológicos importantes e inéditos no país.

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: www.abiec.com.br . Acesso em: 16 Dez, 2006.

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996 – 1999. **Vet. Microbiol.**, v. 99, p. 167-173, 2004.

ANUALPEC - **Anuário da pecuária brasileira**, p.104-108, ed. Argos Comunicação, São Paulo, 2006.

AUGUSTYNOWICZ, E.; GZYL, A.; SLUSARCZYK, J. Molecular Epidemiology Survey of Toxinogenic *Clostridium perfringens* Strain Types by Multiplex PCR. **J. Infect. Dis.**, v. 32, p. 637- 641, 2000.

BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for Toxin Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 100, 11-16, 2004.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263p.

BUOGO, C.; CAPAUL, S.; HANI, H.; FREY, J.; NICOLET, J. Diagnosis of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). **J. Vet. Med. B**, v. 42, p. 51- 58, 1995.

CARTER, G.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991.

CARTER, G.; COLE, JUNIOR, J. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 229-51.

CRAIG, J. P.; MILES, A. A. Some properties of the iota toxin of *Clostridium welchii* including its action on capillary permeability. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 81, p. 481-493, 1961.

COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.) **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford University, 1994. v. 2, 1290-1298.

DAUBE, G.; CHINA, B.; SIMON, P.; HVALA, K.; MAINIL, J. Typing of *Clostridium perfringens* by *in vitro* amplification of toxin genes. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, p. 650– 655, 1994.

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

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 66– 98, 1990.

HUNTER, S. E. C.; BROWN, J. E.; OYSTON, P. C. F.; SAKURAI, J.; TITABALL, R. W. Molecular genetic analysis of beta toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3958– 3965, 1993.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A.; SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil, **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, p. 313- 319, 2004.

LEMOS, R. A. A.; COELHO, A. C. Enfermidades caracterizadas por diarreia. In: LEMOS, R. A. A. (ed.) **Principais Enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p. 265-294, 1998.

McDONEL, J. L. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. In: DORNER, F.; DREWS, J. (ed.). **Pharmacology of bacterial toxins**. Oxford: Pergamon Press, 1986. p. 477– 517.

MISEREZ, R.; FREY, J.; BUOGO, C.; CAPAUL, S.; TONTIS, A.; BURNENS, A.; NICOLET, J. Detection of alpha and entero- toxigenic *Clostridium perfringens* Type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR), **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 382- 386, 1998.

MOLLER, K.; AHRENS, P. Comparison of Toxicity Neutralization-, ELISA-, and PCR Tests for Typing of *Clostridium perfringens* and Detection of the Enterotoxin Gene by PCR. **Anaerobe**, 2, 103-110, 1996.

NIILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. **Can. Vet. J.**, v. 21, p. 141- 148, 1980.

ODENDAAL, M. W. *Clostridium perfringens* group. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.) **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford University, 1994. v. 2, 1290-1298.

PIATTI, R. M.; IKUNO, A. A.; BALDASSI, L. Detection of Bovine *Clostridium perfringens* by Polymerase Chain Reaction. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 10, p. 154-160, 2004.

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

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clostridium* species. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. London Wolfe, 1994. p.191-208.

ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. **The Clostridia**: molecular biology and pathogenesis. London: Academic Press, 1997. 533p.

SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 741- 745, 1977.

SAS Institute. Sas/stas software: changes and enhancements though release **Statistical Analysis System Institute**, 2002.

SCHUCH, L. F. D. Diarréia dos bezerros. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (Ed.) **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. v. 1, 408-418.

SIPOS, W.; FISCHER, L.; SCHINDLER, M.; SCHMOLL, F. Genotyping of *Clostridium perfringens* Isolated from Domestic and Exotic Ruminants and Swine. **J. Vet. Med. B**, v. 50, p. 360- 362, 2003.

SONGER J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 216- 234, 1996.

SONGER J. G.; BUESCHEL, D. Multiplex PCR Procedure for Genotyping *Clostridium perfringens*. Disponível em: (<http://microvet.arizona.edu/Faculty/songer/multiplexprocedure.pdf>) Acesso em: 3 Jan 2006.

UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; O'BOYLE, D.; KELLY, W. R. Detection by Polimerase Chain Reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and gastrointestinal contents of goats. **Lett.Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 13-17, 1996.

VALSECCHI, E. Tissue boiling: a short-cut in DNA extraction for large-scale population screenings. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 1243-1245, 1998.

YOO, H. S.; LEE, S. U.; PARK, K. Y.; PARK, Y. H. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.1, p. 228- 232, 1997.

YOUHANNA, S. S., SONGER, J. G. *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. **Anaerobe**, v. 12, 23-43, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Meio de Tioglicolato

Preparo do Meio

Avaliar quantos tubos de vidro pyrex com tampa de rosca (75 x 15 mm), com aproximadamente 5 mL do meio, serão utilizados.

Calcular e pesar a quantidade necessária do meio Tioglicolato (Caldo Tioglicolato, OXOID[®]) para a quantidade de água destilada utilizada.

Misturar o meio com a água destilada, até dissolver, em um balão de vidro pyrex com capacidade para 1000 mL.

Aquecer o meio em microondas até fundir bem (dissolver toda porção solúvel).

Com uma pipeta graduada, passar 5 mL do meio de Tioglicolato para os tubos de vidro pyrex.

Colocar os tubos já tampados (deixar as tampas frouxas) em um recipiente para serem esterilizados em autoclave.

Embrulhar o recipiente com papel pardo e vedar com fita crepe.

Esterilizar o meio em autoclave à 120° C por 15 minutos.

Após autoclavagem, fechar bem as tampas dos tubos pyrex.

Identificar os tubos com o nome do meio e data de produção.

E armazená-los em geladeira à 4° C.

Material Utilizado

- tubos de vidro pyrex (75 x 15 mm) com tampa de rosca
- balança analítica (SA 210, Scientech[®])
- balão de vidro pyrex (1000 mL)
- proveta graduada
- pipeta graduada
- água destilada
- papel pardo (20 x 15 cm) e fita crepe
- autoclave vertical (Phoenix[®])

- fluxo laminar (Bio Protector Plus – 09, Veco[®])
- medidor de pH (pH Meter GLP 22, Crison[®])
- bico de Bunsen
- meio de cultura Caldo Tioglicolato, OXOID[®] (CM 173, 500g, lote 317583, validade 09/2009).

Composição do Caldo Tioglicolato, OXOID[®]

- extrato de levedura..... 5,0 g/L
- triptona..... 15,0 g/L
- glicose..... 5,5 g/L
- tioglicolato de sódio..... 0,5 g/L
- cloreto de sódio..... 2,5 g/L
- L-cistina..... 0,5 g/L
- rezarzurina..... 0,001 g/L
- agar..... 0,75 g/L
- pH final..... 7,1 +/- 0,2

APÊNDICE B

Meio de Agar Sangue

Coleta do Sangue

Montar e esterilizar o desfibrinador de sangue.

Esterilizar aproximadamente 10 tubos de vidro pyrex (150 x 30 mm), com tampa de rosca.

Com o desfibrinador estéril, coletar cerca de 250 mL de sangue de carneiro sadio.

Mexer constantemente até formar um coágulo de fibrina consistente.

Separar o coágulo do sangue desfibrinado.

Encher os tubos de vidro com 25 mL do sangue desfibrinado, identificar e datar os tubos e armazená-los em geladeira à 4° C.

Preparo do Meio

Calcular e pesar a quantidade necessária do meio Base Agar Sangue (Blood Agar Base, OXOID®) para 500 mL de água destilada.

Misturar o meio com a água destilada, até dissolver, em um balão de vidro pyrex com capacidade para 1000 mL.

Tampar o balão com tampão de algodão e gaze.

Embrulhá-lo com papel pardo e vedar com fita crepe.

Esterilizar o meio em autoclave à 120° C por 15 minutos.

Após autoclavagem, esfriar o balão em que o meio de agar sangue se encontra até aproximadamente 45° C (temperatura suportável ao toque).

Misturar 01 tubo com 25 mL de sangue de carneiro (5%) para cada 500 mL de meio base agar sangue.

Distribuir cerca de 20 mL do meio agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado em cada placa de Petri (90 x 15 mm).

Esperar até o meio endurecer.

Identificar as placas com o nome do meio e data de produção.

Envolver as placas em papel filme e armazená-las, com a parte endurecida do meio para cima da placa e tampa para baixo, em geladeira à temperatura de 4° C.

Material Utilizado

- desfibrinador de sangue
- agulha estéril (30 x 15 mm)
- manguito de borracha
- carneiro adulto e sadio
- tubos de vidro pyrex (150 x 30 mm) com tampa de rosca
- balança analítica (SA 210, Scientech®)
- balão de vidro pyrex (1000 mL)
- proveta graduada para 500 mL
- água destilada
- tampão de algodão envolto por gaze
- papel pardo (20 x 15 cm) e fita crepe
- autoclave vertical (Phoenix®)
- fluxo laminar (Bio Protector Plus – 09, Veco®)
- medidor de pH (pH Meter GLP 22, Crison®)
- bico de Bunsen
- placas de Petri (90 x 15 mm)
- papel filme
- meio de cultura Blood Agar Base, OXOID® (CM 0055, 500g, lote 426996, validade 2010/11).

Composição do Meio Blood Agar Base, OXOID®

- extrato de carne..... 10,0 g/L
- peptona neutralizada..... 10,0 g/L
- cloreto de sódio 5,0 g/L
- agar..... 15,0 g/L
- pH final..... 7,3 +/- 0,2

APÊNDICE C

Meio Seletivo para *Clostridium perfringens*

Preparo do Meio

Calcular e pesar a quantidade necessária do meio de cultura seletivo para *Clostridium perfringens* (Perfringens Agar Base, PAB, HIMEDIA®) para 475 mL de água destilada.

Misturar o meio com a água destilada, até dissolver, em um balão de vidro pyrex com capacidade para 1000 mL.

Em um outro balão de vidro pyrex, colocar 100 mL de água destilada.

Tampar os balões com tampão de algodão e gaze.

Embrulhá-los com papel pardo e vedá-los com fita crepe.

Esterilizá-los em autoclave à 120° C por 15 minutos.

Após autoclavagem, esfriar o balão em que o meio PAB se encontra até aproximadamente 45° C (temperatura suportável ao toque).

Misturar 2 mL da água destilada estéril no frasco de antibiótico S.F.P Supplement (FD 013, HIMEDIA®), dissolver bem e passar o conteúdo para o balão contendo o meio PAB.

Com uma pipeta graduada e estéril, medir 25 mL da emulsão de gema de ovo (Egg Yolk Emulsion, FD 045, HIMEDIA®) e misturar no meio de PAB.

Distribuir cerca de 20 mL do meio PAB (acrescido de S.F.P e Egg Yolk Emulsion) em cada placa de Petri (90 x 15 mm).

Esperar até o meio endurecer.

Identificar as placas com o nome do meio e data de produção.

Envolver as placas em papel filme e armazená-las, com a parte endurecida do meio para cima da placa e tampa para baixo, em geladeira à 4° C.

Material Utilizado

- balança analítica (SA 210, Scientech®)
- balão de vidro pyrex (1000 mL)

- balão de vidro pyrex (300 mL)
- proveta graduada para 500 mL
- água destilada
- tampão de algodão envolto por gaze
- papel pardo (20 x 15 cm) e fita crepe
- autoclave vertical (Phoenix[®])
- fluxo laminar (Bio Protector Plus – 09, Veco[®])
- medidor de pH (pH Meter GLP 22, Crison[®])
- bico de Bunsen
- placas de Petri (90 x 15 mm)
- papel filme
- meio de cultura Perfringens Agar Base, HIMEDIA[®] (M 837, 500g, lote WI 246, validade 10/2011)
- Suplemento S.F.P, HIMEDIA[®] (FD 013, 5 vias por caixa)
- Emulsão de gema de ovo (Egg Yolk Emulsion), HIMEDIA[®] (FD 045, 5 vias de 100 mL por caixa)

Composição do Perfringens Agar Base, HIMEDIA[®]

- | | |
|---------------------------------------|-------------|
| - triptose..... | 15,0 g/L |
| - papaic digest of soyabean meal..... | 10,0 g/L |
| - beef extract..... | 5,0 g/L |
| - yeast extract..... | 5,0 g/L |
| - sodium metabisulphite..... | 1,0 g/L |
| - ferric ammonium citrate..... | 1,0 g/L |
| - agar..... | 15,0 g/L |
| - pH final..... | 7,6 +/- 0,2 |

Composição do Egg Yolk Emulsion, HIMEDIA[®]

- | | |
|-----------------------|---------|
| - gema de ovo..... | 30,0 mL |
| - salina estéril..... | 70,0 mL |

Composição do Suplemento S.F.P, HIMEDIA®

- sulfato de kanamicina..... 6,00 mg
- polimixina B..... 15,000 UI

APÊNDICE D

Meio de Infusão Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion - BHI)

Preparo do Meio

Avaliar quantos tubos de vidro pyrex com tampa de rosca (75 x 15 mm), com aproximadamente 5 mL do meio, serão utilizados.

Calcular e pesar a quantidade necessária do meio BHI (Caldo de Infusão Cérebro e Coração, HIMEDIA[®]) para a quantidade de água destilada utilizada.

Misturar o meio com a água destilada, até dissolver, em um balão de vidro pyrex com capacidade para 1000 mL.

Aquecer o meio em microondas até fundir bem (dissolver toda porção solúvel).

Com uma pipeta graduada, passar 5 mL do meio de BHI para os tubos de vidro pyrex.

Colocar os tubos já tampados (deixar as tampas frouxas) em um recipiente para serem esterilizados em autoclave.

Embrulhar o recipiente com papel pardo e vedar com fita crepe.

Esterilizar o meio em autoclave à 120° C por 15 minutos.

Após autoclavagem, fechar bem as tampas dos tubos pyrex.

Identificar os tubos com o nome do meio e data de produção.

E armazená-los em geladeira à temperatura de 4° C.

Material Utilizado

- tubos de vidro pyrex (75 x 15 mm) com tampa de rosca
- balança analítica (SA 210, Scientech[®])
- balão de vidro pyrex (1000 mL)
- proveta graduada
- pipeta graduada
- água destilada
- papel pardo (20 x 15 cm) e fita crepe

- autoclave vertical (Phoenix[®])
- fluxo laminar (Bio Protector Plus – 09, Veco[®])
- medidor de pH (pH Meter GLP 22, Crison[®])
- bico de Bunsen
- meio de cultura Caldo Infusão Cérebro Coração, BHI, HIMEDIA[®] (CAT. M210, 500g, lote 0000017323, validade 05/2012).

Composição do Caldo BHI, HIMEDIA[®]

- infusão de cérebro de bezerro.....	200,0 g/L
- infusão de coração de boi.....	250,0 g/L
- peptona proteose.....	10,5 g/L
- dextrose.....	2,0 g/L
- cloreto de sódio.....	5,0 g/L
- fosfato dipotássico.....	2,5 g/L
- pH final.....	7,4 +/- 0,2