

Prhiscylla Sadanã Pires

**ESTUDO PATOLÓGICO, PADRONIZAÇÃO E USO DA IMUNO-
HISTOQUÍMICA EM ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE E
NATURALMENTE INFECTADOS COM CLOSTRÍDIOS
HISTOTÓXICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte
UFMG-Escola de Veterinária
2011

P667e Pires Prhiscylla Sadanã, 1985-

Estudo patológico, padronização e uso da imuno-histoquímica em animais experimentalmente e naturalmente infectados com clostrídios histotóxicos / Prhiscylla Sadanã Pires. – 2011.

61 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Animais – Doenças – Teses. 2. Imunohistoquímica – Teses.
3. *Clostridium* – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 69

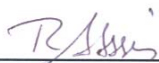
Dissertação defendida e aprovada em 02 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Orientador



Prof. Pedro Soares Bezerra Júnior



Prof. Ronnie Antunes Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me cercado de meios e pessoas necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e renúncias diversas em prol da realização dos meus sonhos.

À Shaiana pela sempre descontraída presença e a Vovó Alice pelo carinho incondicional.

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato, orientador desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência.

À Professora. Roselene Ecco, co-orientadora desta dissertação, por sua ajuda, interesse, desprendimento e competência incomuns.

Gostaria de ratificar a competência dos meus orientadores, participando com discussões, correções, revisões e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Ao Marcelo por sempre me encorajar a transpor os obstáculos.

À equipe do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa (Felipe Salvarani, Rodrigo Silva, Ana Passarella, Renata Santos, Marina Duarte e Lucas Queiroz) e do Laboratório de Histopatologia (Marina Rios) que sempre me deram força e foram muito presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Ao Professor Eurípedes Guimarães e a Nickolly Ribas, por disponibilizarem o material necessário para realização de parte deste trabalho.

Aos colaboradores da FUNED (Luis Heneine e Juliana Lobato) e do LANAGRO (Ronnie Assis e Augusto Carvalho) que contribuíram com etapas fundamentais para realização desse trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	LITERATURA CONSULTADA.....	12
2.1	Gangrena Gasosa e Carbúnculo Sintomático	12
2.2	<i>Clostridium septicum</i>	13
2.3	<i>Clostridium chauvoei</i>	15
2.4	<i>Clostridium novyi</i> tipo A.....	16
2.5	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	18
2.7	Considerações sobre imuno-histoquímica	23
2.8	Diagnóstico de clostrídios histotóxicos pela imuno-histoquímica	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Local de realização do experimento	26
3.2	Animais utilizados.....	26
3.3	Cepas de referências de bactérias do gênero <i>Clostridium</i>	26
3.4	Produção de soro hiperimune anti- <i>Clostridium septicum</i> , anti- <i>C. chauvoei</i> , anti- <i>C. novyi</i> tipo A, anti- <i>C. perfringens</i> tipo A e anti- <i>C. sordellii</i>	26
3.5	Obtenção das Imunoglobulinas	27
3.6	Inoculação em cobaias, coleta e preparo das amostras de tecidos	27
3.7	Processamento do material para a técnica de imuno-histoquímica	28
3.8	Diluição de trabalho do anticorpo primário	29
3.9	Estudo retrospectivo de mionecrose a partir do material com diagnóstico clínico de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa realizados entre os anos de 2000 e 2010 no Mato Grosso do Sul	29
4	RESULTADOS	29
4.1	Cultivo e caracterização das cepas bacterianas de clostrídios histotóxicos	29
4.2	Produção de anticorpos anti- <i>Clostridium septicum</i> , anti- <i>C. chauvoei</i> , anti- <i>C. novyi</i> tipo A, anti- <i>C. perfringens</i> tipo A e anti- <i>C. sordellii</i> e purificação de imunoglobulinas G	30
4.3	Descrição do curso clínico e alterações patológicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com clostrídios histotóxicos e nos grupos controles inoculados com CaCl ₂ a 5%	31
4.4	Descrição das alterações macroscópicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com CaCl ₂ a 10% e com clostrídios histotóxicos.....	32
4.5	Descrição das alterações histológicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com CaCl ₂ a 5% e com clostrídios histotóxicos.....	36
4.6	Imuno-histoquímica dos cobaios experimentalmente infectados com clostrídios histotóxicos.....	40

4.7	Frequência, histopatologia e diagnóstico etiológico pela imuno-histoquímica, empregando a técnica LSAB, em espécimes clínicos de ruminantes que morreram com suspeita de mionecroses possivelmente causadas pelos clostrídios histotóxicos entre os anos de 2000 e 2010 no Mato Grosso do Sul.....	44
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ação da toxina alfa de <i>Clostridium perfringens</i> em células eucariotas.....	19
Figura 2.	Mecanismo de ação da toxina letal de <i>Clostridium sordellii</i>	22
Figura 3.	Etapas da Técnica de Imuno-histoquímica.....	24
Figura 4.	Técnicas de imuno-histoquímica.....	24
Figura 5.	Protocolo de inoculação para obtenção de soro hiperimune de coelhos contra <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> tipo A, <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e <i>Clostridium sordellii</i>	27
Figura 6.	Título de anticorpos aglutinante frente ao <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> tipo A, <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e <i>Clostridium sordellii</i>	30
Figura 7.	Fotos dos cobaias inoculados experimentalmente com CaCl ₂ a 10% e com as cepas de clostrídios histotóxicos.....	36
Figura 8.	Histopatoloia do músculo da área de inoculação colhido de cobaias experimentalmente inoculados com CaCl ₂ a 10% e com as amostras de clostrídios histotóxicos (Coloração de Hematoxilina e Eosina).....	40
Figura 9.	Imuno-histoquímica (LSAB) dos cobaias inoculados experimentalmente com CaCl ₂ a 10% e com as cepas de clostrídios histotóxicos.....	42
Figura 10.	Distribuição dos casos de mionecrose em ruminantes, entre os anos de 2000 e 2010, recebidos pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.....	45
Figura 11.	Idade dos bovinos que morreram com suspeita clínica de mionecrose entre os anos de 2000-2010 pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.....	45
Figura 12.	Diagnóstico etiológico pela imuno-histoquímica dos materiais coletados de bovinos que morreram com suspeita clínica de mionecrose entre os anos de 2000-2010 no Mato Grosso do Sul.....	46

TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as exotoxinas de grande peso molecular produzidas por <i>Clostridium novyi</i> , <i>Clostridium difficile</i> e <i>Clostridium sordellii</i>	17
Tabela 2. Classificação dos diferentes tipos de <i>Clostridium perfringens</i> em relação às principais exotoxinas.	18
Tabela 3. Atividade das principais exotoxinas produzidas por <i>Clostridium sordellii</i>	21
Tabela 4. Definição dos grupos experimentais de cobaias inoculadas com solução de CaCl ₂ 5% e suspensões bacterianas de clostrídios histotóxicos com CaCl ₂ 10%.	28
Tabela 5. Caracterização das cepas de referência de clostrídios histotóxicos quanto a morfologia das colônias obtidas em ágar sangue e pela coloração de Gram.	30
Tabela 6. Dosagem protéica do soro hiperimune total e da alíquota precipitada de imunoglobulinas G de coelhos inoculados com <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> tipo A, <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e <i>Clostridium sordellii</i>	31
Tabela 7. Tempo entre inoculação e morte do primeiro cobaio dos grupos experimentalmente inoculados com cepas de referência de clostrídios histotóxicos.	32
Tabela 8. Comparação das alterações anatomo-patológicas observadas em cobaias inoculadas com clostrídios histotóxicos.	34
Tabela 9. Diferenças quanto à intensidade e tipos de alterações histológicas observadas em cobaias experimentalmente infectadas com clostrídios histotóxicos.	37
Tabela 10. Diluição do anticorpo primário anti- <i>Clostridium septicum</i> , anti- <i>C. chauvoei</i> , anti- <i>C. novyi</i> tipo A, anti- <i>C. perfringens</i> tipo A e anti- <i>C. sordellii</i> e quantidade aproximada de proteínas por lâminas necessária para imuno-histoquímica.	41
Tabela 11. Diagnóstico imunoistoquímico associado a intensidade das lesões encontradas nos tecidos de ruminantes naturalmente infectados com clostrídios histotóxicos.	47

RESUMO

Padronizou-se um teste de imuno-histoquímica (IHQ) para detectar *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* utilizando tecidos obtidos de cobaias experimentalmente infectadas com essas cepas. Além disso, estabeleceu-se a etiologia das mionecrose em um estudo retrospectivo de amostras provenientes de bovinos do Mato Grosso do Sul (MS) com diagnóstico clínico e/ou patológico de mionecrose. Os anticorpos primários foram obtidos após repetidas inoculações (dias 0, 28, 49, 70 e 91) de coelhos com cepas de referência de clostrídios histotóxicos. A purificação das imunoglobulinas foi realizada por meio de uma cromatografia de afinidade em coluna de proteína G sepharose. Para padronização da IHQ, as secções histológicas dos cobaias inoculados foram bloqueadas e incubadas sucessivamente com: anticorpo primário, cuja diluição foi previamente padronizada, anticorpo secundário biotilado e estreptavidina conjugada com peroxidase. A mesma técnica de IHQ foi utilizada no diagnóstico etiológico de mionecroses em material de ruminantes oriundos do MS (n=32). Tanto o protocolo de produção de soro hiperimune quanto o de purificação foram considerados satisfatórios para obtenção de anticorpo primário com elevados títulos na aglutinação (1:1.000 a 1:100.000) e na IHQ (1:30 a 1:4.000). Cerca de 22% dos casos foram positivos apenas para *C. chauvoei*, seguido de 19% positivos para *C. perfringens* tipo A. Os demais apresentaram associação de dois ou mais agentes. Com relação a frequência de cada um dos clostrídios estudados no diagnóstico retrospectivo, *C. chauvoei* foi o mais prevalente (73,3%), seguido por *C. perfringens* tipo A (53,3%), *C. septicum* (33,3%), *C. sordellii* (13,3) e *C. novyi* tipo A (10%). A técnica de IHQ padronizada mostrou-se eficiente na detecção de clostrídios histotóxicos. O padrão de distribuição dos bastonetes e as alterações histológicas foram semelhantes entre os grupos de cobaias experimentalmente e os naturalmente infectados. *C. perfringens* tipo A aparenta ser também, um agente causador de mionecrose em bovinos e ovinos, fato este que demonstra a importância desse agente ser também incluído nas vacinas contra o carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa.

Palavras-chave: *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium sordellii*, mionecrose.

ABSTRACT

An immunohistochemistry (IHC) was optimized to detect *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* type A, *C. perfringens* type A and *C. sordellii* using tissues obtained from guinea pigs experimentally infected with these strains. Furthermore, we established the etiologic diagnosis of myonecrosis in a retrospective study of samples from Mato Grosso do Sul (MS). Primary antibodies were obtained after repeated inoculations (days 0, 28, 49, 70 and 91) of rabbits with reference strains of *Clostridium* histotóxicos. Purification of immunoglobulins was performed using an affinity chromatography column of protein G sepharose. For standardization of IHC technical, histological sections from inoculated animals were blocked and incubated successively with: primary antibody, which the dilution was previously standardized dilution, biotinylated secondary antibody and streptavidin peroxidase conjugate. The IHC was used to establish the etiological diagnosis of myonecrosis in ruminant material from MS (n = 32). The protocol for the production of hyperimmune serum and the purification were considered satisfactory for obtaining primary antibody with high titers in the agglutination (1:1000 to 1:100,000) and IHC (1:30 to 1:4,000). Most cases from MS showed positive signal for *C. chauvoei* (22%), followed by a positive *C. perfringens* type A (19%). Other samples showed an association of two or more agents. Concerning the frequency of each of the clostridia studied, *C. chauvoei* was the most prevalent (73.3%) among the sections classified as positive, followed by *C. perfringens* type A (53.3%), *C. septicum* (33.3%), *C. sordellii* (13.3) and *C. novyi* type A (10%). The standard technique was efficient to detect all clostridia tested. The distribution pattern of the rods and histological changes were similar in both groups of animals experimentally and naturally infected and confirm data previously reported. *C. perfringens* tipo A apparently is also a cause of mionecrosis in bovine and sheep. This evidence showed the importance of this agent and could be included in vaccines against black leg and gas gangrene.

Key words: *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* type A, *Clostridium perfringens* type A, *Clostridium sordellii*, mionecrosis.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes Gram positivos, anaeróbios obrigatórios e ubiqüitários, podendo ser encontradas no solo, água, alimentos e como comensais do trato digestivo de animais e seres humanos. O grupo de infecções e intoxicações altamente letais causadas por esses microrganismos são chamadas clostridioses (Lobato et al., 2007).

Dentre as clostridioses, as mionecroses, representadas pela gangrena gasosa e carbúnculo sintomático, são as que acarretam maiores perdas para a pecuária brasileira. Particularmente, em Minas Gerais, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2005, foram registrados, segundo o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais, 14.895 casos de mionecroses atingindo um dos maiores índices de mortalidade entre as doenças infecciosas de bovinos (Solange Olinda, comunicação pessoal)⁽¹⁾.

A gangrena gasosa ou edema maligno é uma infecção exógena e necrosante de tecidos moles que acomete bovinos (Assis et al., 2002), ovinos, caprinos (Lima et al., 2006), suínos (Pinto et al., 2005), eqüinos (Peek et al., 2003) e aves comerciais (Tellez et al., 2009). Essa patologia é causada por uma ou pela associação das seguintes espécies do gênero *Clostridium*: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. A ocorrência dessa doença está relacionada ao estrito contato entre estes agentes e os animais domésticos, o que favorece a contaminação de feridas decorrentes de práticas cirúrgicas e/ou de manejos realizados sem cuidados assépticos. Além disso, a injúria tecidual promove diminuição do potencial de oxi-

redução, alcalinização do pH e decomposição de produtos protéicos. Esses fatores contribuem para penetração, germinação e intensa proliferação de clostrídios, com conseqüente produção de toxina, a qual é responsável pelo quadro patológico da doença.

Os animais acometidos apresentam edema com crepitação subcutânea, sinais generalizados de toxemia e muitos deles morrem subitamente. De erradicação praticamente impossível, o controle e profilaxia dessa clostridiose é baseado na vacinação sistemática do rebanho com bacterinas e toxóides específicos, além de práticas adequadas de manejo (Lobato et al., 2007). Os prejuízos econômicos causados por esta enfermidade são difíceis de serem avaliados, em razão da escassez de dados disponíveis. Entretanto, devido à alta letalidade estima-se que estes sejam elevados. No Brasil, apesar do significativo número de focos, a maior parte dos diagnósticos é baseada apenas em sinais clínicos pouco conclusivos e/ou lesões de necropsia, existindo poucos relatos de confirmação laboratorial.

O isolamento bacteriológico normalmente requer procedimentos laboratoriais demorados, dispendiosos e pessoal treinado. A imunofluorescência direta (IFD), método diagnóstico padrão ouro, tem sido empregada mundialmente e é considerada uma técnica rápida e segura. Entretanto, requer, para sua execução, microscópio especial, anticorpos primários marcados com fluorocromos e material fresco ou especialmente processado (Assis et al., 2001).

Uma alternativa para o diagnóstico dessa enfermidade seria a utilização da imunohistoquímica (IHQ) que, ao combinar as técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, permite localizar os componentes tissulares *in situ* mediante o emprego de anticorpos específicos e moléculas marcadoras. Essa técnica apresenta como vantagem a utilização de

⁽¹⁾ Solange Olinda. Comunicação pessoal 2007 (Serviço de Sanidade Animal –SSA/DFA/MG), Minas Gerais, Brasil.

materiais fixados em formol, aumentando-se o prazo entre coleta e processamento laboratorial sem, contudo, interferir no diagnóstico (Ramos-Vara et al., 2008). A ampliação desse prazo, sem prejuízo do material clínico coletado, é de extrema relevância em medicina veterinária, pois grande parte das propriedades rurais está distante dos centros de diagnóstico e pesquisa. Além disso, a fixação dos tecidos evita a autólise dos mesmos impedindo que clostrídios saprófitos se multipliquem. Todos esses fatores aumentam a precisão do diagnóstico etiológico, informação que possibilita a adoção de esquemas de imunização adequados além de servir de referência para a indústria produtora de vacinas. Por sua vez, o diagnóstico etiológico permite que o esquema de imunização seja planejado conforme a frequência dos agentes diagnosticados, aumentando a eficiência das medidas preventivas no controle dessa clostridiose.

O objetivo desse trabalho foi padronizar o teste IHQ para detecção de cinco espécies diferentes de *Clostridium* histotóxicos em cobaias inoculadas experimentalmente e estabelecer o diagnóstico etiológico de mionecrose em ruminantes, em um estudo retrospectivo de materiais provenientes da Escola de Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Gangrena Gasosa e Carbúnculo Sintomático

Clostrídios histotóxicos são patógenos comuns em humanos e animais capazes de causar miosites necrosantes, geralmente fatais. Em animais, o controle por vacinação tem diminuído a incidência e talvez também a visibilidade de algumas clostridioses, mas o interesse renovado nos mecanismos de patogênese e, em algum grau, o interesse contínuo na prevenção de infecções clostridiais têm produzido novas e importantes pesquisas (Lobato et al., 2007).

Causada principalmente por bactérias do gênero *Clostridium*, a gangrena gasosa

pode ser classificada em três apresentações: pós traumática, pós operatória e espontânea (Gentile et al., 1999). As apresentações pós traumática e operatória estão relacionadas com a contaminação de feridas que não receberam tratamento asséptico adequado. A forma espontânea ou não traumática da doença é rara, os relatos são basicamente restritos a humanos infectados por Clostrídios aerotolerantes que infectam tecidos ainda não desvitalizados. Em geral, essa apresentação da doença associa-se com outras enfermidades debilitantes como carcinomas intestinais, infarto, diabetes, AIDS, dentre outras (Dylewski et al., 2007). Para se ter uma idéia da ocorrência de cada uma das apresentações, nos Estados Unidos, acontece cerca de 1.000 casos de mionecroses em humanos causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, por ano, sendo 50% dos casos pós-traumática, 10% pós cirúrgica e 40% espontânea (Abella et al., 2003). Apesar de raras, as descrições sobre a forma espontânea da doença em animais é, em geral denominada pseudo-carbúnculo sintomático. Essa forma de apresentação mimetiza o carbúnculo sintomático foi descrita apenas em suíno, no entanto, *C. septicum* foi o agente isolado (Van Vleet e Valentine, 2007).

Embora não se tenha dados assertivos sobre a frequência das três formas de apresentação em animais, a patogênese considerada mais comum relaciona-se com uma injúria prévia (acidental ou cirúrgica) que permite a penetração de esporos ou de células bacterianas vegetativas. O dano vascular, gerado por algumas lesões, possibilita o estabelecimento de uma atmosfera anaeróbica, requerida para a germinação dos esporos que podem estar presentes no solo, água ou até mesmo na pele não adequadamente desinfetadas (Rood, 1998). O crescimento bacteriano, rápido quando o meio é rico em nutrientes, é acompanhado por produção de exotoxinas e gás que promovem danos a perfusão tissular, associado a alterações quanto a agregação plaquetária e migração de leucócitos (Hickey, et al., 2008). Por isso, os músculos desvitalizados, são altamente suscetíveis as bactérias histotóxicas do

gênero *Clostridium* que determinam uma necrose muscular extensa com edema hemorrágico e formação de gás (Van Vleet e Valantine 2007). A necrose da fibra muscular esquelética, observadas em infecções provocadas por esses clostrídios, geralmente acontece de forma segmentar, ou seja, afetando inicialmente apenas um segmento de fibra. A lesão inicial é com frequência, hipercontração, que resulta em segmentos de coloração mais eosinofílica e de diâmetro maior. O sarcoplasma do segmento de fibra muscular afetada apresenta uma cor mais vermelha e homogênea, com perdas de estriações e do mionúcleo daquele segmento (degeneração hialina). Com a progressão da doença, o segmento necrótico começa a se fragmentar e as porções fragmentadas passam a ter aspecto de flocos (necrose flocular) (Barros, 2010).

A gangrena gasosa, uma infecção, considerada exógena, pode ser causada por um ou mais dos seguintes agentes: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* (Lima et al., 2006). Por sua vez, o carbúnculo sintomático resulta da ativação de esporos latentes de *C. chauvoei* depositados no músculo após transporte na circulação a partir do intestino, possivelmente veiculado por macrófagos (Gyles, 1993). Bovinos jovens, entre seis e 24 meses, com elevado patamar nutricional são os mais susceptíveis (Sojka et al., 1992). Traumas, principalmente nas grandes massas musculares, criam um ambiente propício para germinação dos esporos e a conseqüente produção de toxinas (Hatheway, 1990), que normalmente culminam com necrose muscular e morte rápida dos animais acometidos. Apesar de incomum, o carbúnculo sintomático visceral é outra forma de apresentação da doença que acomete cordeiros (Glastonbury et al., 1988) e bovinos (Helman et al., 1997), afetando miocárdio, diafragma e língua. Quando as lesões ocorrem no músculo esquelético dos membros levam à claudicação, na língua podem produzir dispnéia, enquanto no miocárdio e diafragma pode resultar em morte súbita sem sinais premonitórios (Gyles, 1993).

Quando a gangrena gasosa ou o carbúnculo sintomático não são rapidamente controlados, o animal desenvolve toxemia sistêmica e choque. A morte ocorre como conseqüência do efeito das toxinas na hemodinâmica do sistema vascular (Rood, 1998) e as lesões encontradas na carcaça compreendem edema, hemorragia e necrose miofibrilar. O estudo histológico de tecidos afetados revela extensa miosite, edema, trombose e infiltração neutrocitária (Hickey, et al., 2008).

O tratamento dessas infecções é notoriamente difícil, pois as mionecroses afetam tecidos que tem a perfusão vascular diminuída, conseqüentemente, as terapias a base de antibióticos tem uma eficiência limitada, sendo freqüentemente combinadas com outras intervenções como a remoção cirúrgica do tecido afetado. Portanto, as medidas gerais se restringem a cuidados de manejo e administração sistemática de imunógenos (Lobato et al., 2010).

2.2 *Clostridium septicum*

C. septicum foi a primeira espécie de clostrídio identificada, sendo denominada na época de *Vibrio septique* por Pasteur e Jubert, em 1877. Antes de receber a nomenclatura atual, foi chamado também de *Bacillus oedematis maligni* por causa de sua associação com o tipo de lesão original (Hatheway, 1990). Trata-se de uma bactéria comumente encontrada no solo e nas fezes de homens e animais domésticos, além de ser um invasor *post-mortem* bastante freqüente, principalmente em carcaças de ruminantes (Songer, 1996). Por isso, nem sempre o isolamento de *C. septicum* em um tecido é uma evidência absoluta que o microrganismo foi o causador da infecção, uma vez que este agente pode invadir rapidamente o restante da carcaça após a morte (Smith, 1884).

C. septicum causa uma série de doenças, mas a mais comumente descrita é a gangrena gasosa em humanos e em animais domésticos como bovinos (Assis et al., 2002; Assis et al., 2010), ovinos e caprinos (Lima et al., 2006), suínos (Pinto et al., 2005), eqüinos (Peek et al., 2003) e

aves (Tellez et al., 2009; Clarck et al., 2010). Essa doença é determinada pela ação de uma ou mais das seguintes toxinas produzidas pelo microrganismo: alfa, beta, gama, delta e neuroaminidase (Hatheway, 1990). A toxina alfa, o mais potente fator tóxico de *C. septicum*, foi descrita, há mais de 65 anos por Alan Bernheimer (Bernheimer, 1944), como uma proteína letal e necrosante. No entanto, a comprovação da atividade tóxica desta proteína só foi confirmada por Ballard et al (1992), que conseguiram purificar esta toxina.

A toxina alfa é secretada pela célula bacteriana e os genes que a codificam podem ser tanto cromossomais quanto plasmidiais. A DL₅₀ para camundongos é de aproximadamente 10µg/kg de peso vivo e o peso molecular da proteína secretada é de aproximadamente 48 KDa (Ballard et al., 1992). Ela se liga aos receptores do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI), normalmente expressos nas células dos hospedeiros e após a adesão na membrana celular a proteína é ativada por clivagem proteolítica, por enzimas do tipo furina, também presentes na membrana das células do hospedeiro (Gordon et al., 1997; Gordon et al., 1999). Os monômeros ativados se difundem lateralmente na membrana até encontrar outro monômero ativado que têm capacidade de interagir e formar um oligômero, conseqüentemente um pré-poro é instalado (Tveten, 2001). Mudanças conformacionais deste oligômero levam a formação de um poro ativo que atravessa a membrana do hospedeiro (Melton-Witt et al., 2006), determinando uma alteração na permeabilidade celular que é seguida por influxo de água intracelular e conseqüente ruptura. Portanto, a toxina exibe sua atividade lítica e citotóxica devido à alteração da permeabilidade celular (Ballard et al., 1993). A toxina alfa causa uma perda massiva de fluidos do sistema circulatório, devido a sua ação primária no endotélio das vênulas, podendo resultar no choque toxêmico (Hatheway, 1990).

A toxina beta, classificada como uma DNase, é um proteína termo-estável que apresenta elevados níveis de toxicidade

para leucócitos. A toxina gama é uma hialuronidase, que age despolimerizando os componentes conjuntivos da musculatura, como o colágeno e ácido hialurônico, diminuindo a adesão celular, aumentando a permeabilidade e difusão de líquidos. A toxina delta é uma hemolisina instável na presença de fatores oxidantes que determina uma hemólise mais precoce que a alfa, embora seja menos potente. Finalmente, a neuroaminidase é uma exotoxina que promove uma alteração nas glicoproteínas de membrana, tornando os sítios infectados vulneráveis ao ataque das demais toxinas produzidas por este microrganismo (Hatheway, 1990).

Nos casos de gangrena gasosa, os sinais clínicos não são específicos, podendo ocorrer febre, anorexia, dor (principalmente na região correspondente a musculatura acometida) e sinais gerais de choque e toxemia (Smith-Slatas et al., 2009). As alterações perceptíveis no hemograma abrangem: hemoconcentração, possivelmente devido à desidratação, hiperfibrinogenemia, em graus que variam de leve a moderado, e leucocitose acentuada com desvio a esquerda regenerativo, decorrente de uma neutrofilia com desvio a esquerda. Em estágios agônicos podem ser observados leucopenia e anemia devido ao efeito leucocítico e hemolítico das toxinas (Lima et al., 2006).

Em animais, as infecções são freqüentemente associadas com feridas traumáticas e/ou cirúrgicas (Tveten, 2001). Portanto, é de se esperar que o tratamento asséptico de feridas e intervenções cirúrgicas sejam suficientes para se eliminar o potencial risco de contaminação, prevenindo a ocorrência da doença. Além disso, a imunização de animais com toxina alfa purificada foi eficiente na indução de títulos protetores de anticorpos (Amimoto et al., 2002), embora a maior parte dos autores indique a utilização de imunógenos contendo bacterina e toxóides (Lobato et al., 2010).

Com relação ao tratamento, verifica-se que a maioria das cepas são resistentes às tetraciclina e sensíveis às penicilinas e

seus derivados. No entanto, estes são de pouco ou nenhum valor para o tratamento dessas enfermidades, pois, em geral, os animais são encontrados mortos ou em estado agônico devido ao curso agudo e/ou superagudo da doença (Gabay et al., 1981; Sasaki et al., 2001).

2.3 *Clostridium chauvoei*

Embora as descrições sobre gangrena gasosa e carbúnculo sintomático tenham sido feitas desde a metade do século XIX, *C. chauvoei* só foi descrito em 1880. Trata-se de uma bactéria amplamente distribuída no solo e trato intestinal de herbívoros (Hang'ombe et al., 2000; Bagge et al., 2009). Esse agente contamina o solo por meio da decomposição de carcaças e pela eliminação de esporos nas fezes (Sathish e Swaminathan, 2008; Bagge et al., 2009). A manutenção de esporos viáveis no ambiente, que podem retornar ao estado vegetativo, é o fator mais significativo para infecção dos animais, pois a ingestão de pastos contaminados com esporos se constitui a principal via de transmissão, principalmente em criatórios em que a doença é endêmica (Sojka et al., 1992).

O agente pode causar tanto a gangrena gasosa quanto o carbúnculo sintomático, principalmente em bovinos jovens (Assis et al., 2010; Sojka et al., 1992), embora o microrganismo também tenha sido identificado em espécimes clínicos oriundos de ovinos, caprinos e eqüinos (Peek et al., 2003). Em algumas partes do mundo, como na Suíça (Bagge et al., 2009), Índia (Sathish e Swaminathan, 2008) e alguns países da África, o carbúnculo tem sido considerado endêmico. Em um estudo realizado no sul da África, por exemplo, foi possível encontrar por meio de imunofluorescência direta *C. chauvoei* em 17,4% das amostras de solo testadas (n=46) (Hang'ombe et al., 2000).

Diferentemente das demais bactérias causadoras de mionecroses, foram realizados poucos estudos buscando elucidar a atividade tóxica e os mecanismos de ação das toxinas produzidas por *C. chauvoei*. Sabe-se que este microrganismo

produz pelo menos cinco antígenos solúveis: hemolisina oxigênio-estável (toxina alfa), uma DNase (toxina beta), uma hialuronidase (toxina gama), uma hemolisina oxigênio-lábil e uma neuroaminidase que são considerados importantes fatores de virulência (Sathish e Swaminathan, 2008).

A toxina alfa foi primeiramente estudada por Moussa (1959) e Verpoort et al (1966) que relataram algumas atividades e características biológicas a partir de filtrados de cultura de *C. chauvoei* não purificados. A toxina foi purificada e parcialmente caracterizada por Tamura et al (1992). Esse pesquisador e seus colaboradores demonstraram que a produção de toxina tem pico máximo na fase logarítmica de crescimento bacteriano e que os eritrócitos de ovinos, bovinos e aves (galinhas) são susceptíveis a ação hemolítica dessa proteína, enquanto as hemácias de caprinos, coelhos e cobaias foram classificadas como parcialmente resistentes e as de eqüinos resistentes. Hang'ombe et al (2006) também analisaram a sensibilidade de eritrócitos oriundos de diferentes espécies de animais e encontraram resultados bastante semelhantes aos de Tamura et al (1992), com a única diferença quanto à sensibilidade, sendo neste trabalho as hemácias de ovinos e naquele as de bovinos. Especula-se que a variação de sensibilidade entre as espécies pode ser explicada pela existência ou ausência de receptores de membranas necessários para a ligação da toxina (Hang'ombe et al., 2006).

Hang'ombe et al (2006) acrescentaram que a toxina tem sua ação dependente da temperatura. Para causar hemólise em 50% dos eritrócitos a quantidade de toxina requerida é muito menor a 30°C, que a 20°C, que por sua vez foi menor que 10°C. A atividade tóxica temperatura dependente é um comportamento observado em toxinas formadoras de poros, como é o caso da toxina alfa de *C. septicum*. No entanto, nenhum estudo conseguiu elucidar, até o momento, o mecanismo de ação da toxina alfa de *C. chauvoei* e nem mesmos as

características físico-químicas desta proteína.

Embora ainda existam poucas informações sobre essa proteína, ela tem sido considerada como o principal fator tóxico dessa espécie de clostrídio, tendo um peso molecular de 27 KDa. A toxina alfa é uma proteína necrosante, hemolítica e letal (Hang'ombe et al., 2006), enquanto a toxina beta tem sido responsabilizada pela degeneração e necrose das células musculares. Embora não exista uma correlação quanto à produção destas toxinas (Sathish e Swaminathan, 2008), ambas são consideradas fundamentais no processo de miosite gangrenosa desencadeados por este microrganismo (Carloni et al., 2005). Apesar da maioria das cepas de *C. chauvoei* serem sabidamente toxigênicas, elas não produzem toxinas com títulos tão elevados como as de *C. septicum* (Hatheway, 1990).

Com relação ao tratamento verifica-se que a maioria das cepas são altamente resistentes aos antibióticos como penicilinas, ampicilinas, amoxicilinas e tetraciclina, algumas podem apresentar moderada resistência a eritromicina e cloranfenicol, sendo a grande maioria sensível ao imipenem e metrazolona (Sasaki et al., 2001). No entanto, como na maioria dos casos de miosites os animais são encontrados mortos ou em estado agônico (Gabay et al., 1981; Sasaki et al., 2001) as medidas gerais se restringem aos cuidados de manejo e na administração sistemática de imunógenos (Lobato et al., 2010). A imunidade contra esse agente está relacionada a antígenos normalmente expressos na parede celular, antígenos solúveis e ao flagelo (Kijima-Tanaka et al., 1998). Micalizzi e Guzman (1997) mostraram que os antígenos de *C. chauvoei* encontrados no flagelo e na membrana celular garantem uma proteção de 75 e 100% respectivamente.

2.4 *Clostridium novyi* tipo A

Clostridium novyi, anteriormente denominado *C. oedematiens*, foi descrito pela primeira vez em 1894. É um bacilo anaeróbico, Gram positivo, móvel, que fermenta glicose, liquefaz gelatina e é indol positivo. Sua ação proteolítica é variável e, assim como *C. chauvoei*, trata-se de um patógeno extremamente sensível ao oxigênio, morrendo rapidamente quando exposto ao ar. Por isso, os meios utilizados para seu cultivo devem ser pré-reduzidos e incubados sob condições estritas de anaerobiose (Hatheway, 1990). Esse microrganismo é classificado em quatro tipos A, B, C e D de acordo com a produção de toxinas. O tipo A produz apenas a toxina alfa e é o agente da gangrena gasosa em humanos e animais domésticos. O tipo B produz, além da toxina alfa, a toxina beta. O tipo C não produz toxinas e o tipo D, hoje denominado *C. haemolyticum*, causa a hemoglobinúria bacilar em bovinos (Songer, 1998). A gangrena gasosa, causada por essa bactéria, já foi descrita em humanos (MacGuigan et al., 2002) e em animais domésticos como bovinos (Assis et al., 2002; Assis et al., 2010), ovinos, caprinos (Lima et al., 2006), suínos (Friendship e Bilkei, 2007) e eqüinos (Oakis et al., 1997; Aleman et al., 2003).

Ao contrário dos demais clostrídios histotóxicos, o gene que codifica a toxina alfa de *C. novyi* tipo A está presente em um fago (Gerhard, 2004) que determina a expressão de uma grande toxina com peso molecular de aproximadamente 250 KDa. Por isso, essa toxina, assim como as toxinas A e B produzidas pelo *C. difficile* e a toxinas hemorrágica (HT) e letal (LT), produzidas pelo *C. sordellii*, faz parte do grupo das grandes toxinas clostridiais, apresentando peso molecular superior a 200 KDa (Ball et al., 1993). Devido à grande similaridade dessas proteínas, uma série de pesquisas tem sido feitas para elucidar os distintos mecanismos de ação e já é possível perceber algumas diferenças entre as grandes toxinas de clostrídios (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre as exotoxinas de grande peso molecular produzidas por *Clostridium novyi*, *Clostridium difficile* e *Clostridium sordellii*.

Propriedade	<i>C. novyi</i> toxina alfa	Toxinas de <i>C. difficile</i>		Toxinas de <i>C. sordellii</i>	
		A	B	HT	LT
Genes responsáveis pela expressão	Fago	Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma
Peso molecular (KDa)	250	308	269	300	260
DMM (ng/Kg)	5	50	50	75	5
Atividade enterotóxica	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Aumento da permeabilidade vascular	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Atividade hemoaglutinante	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente

Fonte: Adaptado de Ball et al (1993).

Quando comparada as demais toxinas com elevado peso molecular, a toxina alfa de *C. novyi* tipo A é a que apresenta menor peso molecular, está entre as mais letais e, semelhantemente às toxinas B de *C. difficile* e LT de *C. sordellii*, não possui atividades enterotóxicas nem hemoaglutinantes. Apesar das similaridades, a toxina produzida pelo *C. novyi* tipo A não é neutralizada pelos anticorpos produzidos contra as toxinas dessas duas outras espécies de clostrídios (Ball et al., 1993).

Como as demais toxinas dos clostrídios histotóxicos, a toxina alfa de *C. novyi* tipo A tem três domínios funcionais distintos: o domínio C-terminal (responsável pela ligação com as células do hospedeiro), o domínio hidrofóbico e central (responsável pela translocação da proteína por vesículas endossomais através do citosol) e um domínio N-terminal enzimático (Busch et al., 2000; Gehard, 2004). Titball et al (2006) descreveram a toxina alfa de *C. novyi* como uma glicosiltransferase de cadeia simples que catalisa a glicosilação de pequenas GTPases, utilizando como co-substrato a UDP-N-acetilglicosamina ou UDP-glicose, transferindo a N-acetilglicosamina para o

aminoácido receptor treonina de proteínas do grupo Rho. A inativação das proteínas Rho, pela ação da toxina alfa, desorganiza os filamentos de actina, resultando em efeitos como arredondamento celular, perda das junções intercelulares e aumento da permeabilidade endotelial que é compatível com o edema observado nas afecções causadas por essa bactéria. Dentre as grandes toxinas de clostrídios, essa é a única que tem a UDP-N-acetilglicosamina como substrato.

Pouco se sabe sobre as possibilidades de tratamento em animais acometidos por gangrena gasosa causada por *C. novyi* tipo A. Em humanos, o tratamento é baseado em debridamento cirúrgico da ferida contaminada e utilização de antibióticos, como gentamicina, penicilinas, metronidazol e clindamicinas são prescritas, mas não existem estudos amplamente difundidos sobre a susceptibilidade das cepas a estes quimioterápicos (McGuigan et al., 2002). Um dos poucos estudos, conduzido por Dornbusch et al (1975), relata que a maioria das cepas são sensíveis a penicilina G, metronidazol, cloranfenicol e eritromicina,

sendo resistentes a clindamicina e lincomicina.

Recentemente, houve um crescente interesse a respeito da biologia de *C. novyi*. Isso por que a utilização de cepas atenuadas e desprovidas do fago que contém os genes da toxina alfa tem sido considerada uma ferramenta promissora no tratamento de grandes tumores de coelhos e camundongos (Dang et al., 2001). Quando esporos dessa bactéria, que recebeu o nome *C. novyi* NT, são injetados subcutaneamente elas atuam apenas nos tumores, eliminando-os por lise sem que os pacientes apresentem quaisquer sinais de septicemia (Diaz et al., 2005).

2.5 *Clostridium perfringens* tipo A

A primeira descrição de *C. perfringens* foi feita a partir de isolados de necropsia de um cadáver com enfisema disseminado (Welch e Nuttal, 1982). Este é, provavelmente, o patógeno mais prevalente no mundo e talvez, por isso, esta tenha sido a primeira bactéria Gram positiva a ter seu mapa genético elucidado (Rood, 1998). Responsável por causar infecções entéricas em humanos e animais, esse agente é também constantemente isolado em casos de celulite anaeróbica e gangrena gasosa, embora seja habitante normal da flora intestinal desses indivíduos (Songer, 1996). Essa espécie de clostrídio difere das demais bactérias do gênero devido a sua relativa aerotolerância, alta e rápida taxa de crescimento e por sua instabilidade genética quanto à expressão dos genes codificadores de toxina (Quinn, 2005). Quando cultivados em ágar sangue ocorre dupla hemólise e o cultivo em ágar gema de ovo resulta em um aumento da turbidez como resultado da digestão da lecitina (Titball et al., 1999).

Apesar das quase 17 exotoxinas descritas, apenas algumas são capazes de causar sérios danos a seus hospedeiros (Tabela 2). A espécie é, então, dividida com base na produção de quatro principais toxinas: alfa, beta, épsilon e iota (Songer, 1996). Estudos feitos com essas toxinas purificadas ressaltam a complexidade da resposta

tissular frente aos diferentes subtipos e explica por que não é possível o amplo entendimento da patogênese das enfermidades causadas por essas bactérias (Hickey et al., 2008).

Tabela 2. Classificação dos diferentes tipos de *Clostridium perfringens* em relação às principais exotoxinas.

Tipo	Alfa	Beta	Épsilon	Iota
A	+			
B	+	+	+	
C	+	+		
D	+		+	
E	+			+

Fonte: Uzal et al (1997)

Os cinco tipos de *C. perfringens* têm uma organização genômica bem parecida e a habilidade de produzir diferentes toxinas refletem a aquisição ou perda de genes específicos. Acredita-se, por exemplo, que as cepas de *C. perfringens* tipo A tenham perdido fatores extra-cromossomais, como plasmídeos, que determinam a produção das outras três exotoxinas. Estudos envolvendo clonagem e seqüenciamento de *C. perfringens* demonstraram que o gene *cpa* e a toxina alfa produzida são muito semelhantes entre as diferentes cepas e subtipos. Além disso, esse gene parece não estar relacionado ao tipo de *C. perfringens*, mostrando-se bastante semelhante nos cinco tipos. Essas observações permitiram concluir que a grande diferença quanto à citotoxicidade referente à toxina alfa tem relação apenas com a regulação da expressão do gene e não com sua estrutura em si (Rood, 1998).

A toxina alfa foi a primeira exotoxina bacteriana a ter sua atividade enzimática demonstrada e, dentre as toxinas produzidas por *C. perfringens*, é a mais estudada. Trata-se de uma metalo-enzima que degrada tanto a lecitina como a esfingomielina (Rood, 1998). A cristalografia dessa proteína identificou três domínios: sinalizador clássico de peptídeo, carboxi-terminal (domínio-C), o domínio hidrofóbico

e amino-terminal (domínio –N). O domínio-C foi classificado como membro da família do domínio β -folhas que promove a interação com os fosfolípides de membrana dependente da presença de cálcio, sendo essa fração da toxina responsável pela adesão da mesma na membrana da célula do hospedeiro (Rood, 1998). O domínio-N é composto por α -hélices que possuem uma típica e potente atividade fosfolipase C, cuja

atividade é localizada numa fenda ocupada por três pontos catalíticos dependentes de zinco (Figura 1). Embora individualmente esses domínios não sejam tóxicos, eles são imunogênicos. A imunização com o domínio c-terminal induz a produção de títulos protetores de anticorpos em camundongos, provavelmente por impedir que a toxina se ligue a membrana (Sakurai et al., 2004).

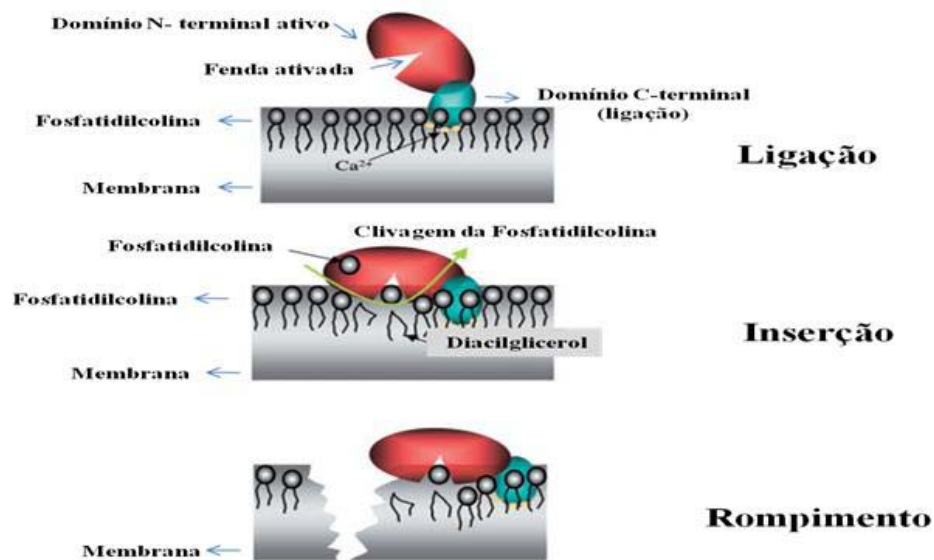


Figura 1. Ação da toxina alfa de *Clostridium perfringens* em células eucariotas. O domínio C-terminal liga na membrana plasmática enquanto o N-terminal cliva a fosfatidilcolina, causando rompimento da membrana. Adaptado de Sakurai et al (2004)

Essa potente toxina (DMM <math><0,1\mu\text{g}/\text{camundongo}</math>) hidrolisa a membrana fosfolipídica de células eucariótica incluindo os eritrócitos, macrófagos, fibroblastos, leucócitos, células endoteliais e musculares, culminando em lise ou outras formas de citotoxicidades (Titball et al., 1999). Além de hemolítica, ela é necrosante e potencialmente letal (Songer, 1996; Hickey et al., 2008). Estudos com a toxina alfa purificada demonstraram que ela é capaz de causar acentuada redução na perfusão vascular (15-40%) uma hora após inoculação intramuscular, sendo também possível observar lesões histológicas. A diminuição do aporte sanguíneo é

responsável pela redução no potencial de oxi-redução tissular, condição que além de favorecer a multiplicação desses clostrídios, contribui com a necrose, embora a morte das fibras musculares ocorra antes da redução substancial do fluxo sanguíneo (Hickey et al., 2008).

O colapso vascular determinado pela ação da toxina alfa abrange uma série de mecanismos sofisticados. As células atacadas pela toxina alfa apresentam uma exarcebação nas concentrações de ácido aracdônico e seus metabólitos. Além disso, os tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas gerados nas células

atacadas levam uma reação inflamatória local e vasoconstrição (Titball et al., 1999). Essa toxina ativa a proteína quinase C, determinando a produção do fator de agregação plaquetária com conseqüente formação de trombos intravasculares fato que contribui para inflamação e anóxia local. A proteína quinase C ativada também determina a ativação das fosfolipases de membrana.

A toxina alfa leva a obstrução luminal de capilares por neutrófilos que se tornam inefetivos em infiltrar os tecidos infectados, fato patognomônico da infecção por *C. perfringens*. As razões da leucoestase são desconhecidas e não se sabe se ela tem um importante papel na mionecrose ou se é apenas um fenômeno secundário, mas acredita-se que possa estar relacionada ao dano que essa toxina causa ao endotélio vascular. A necrose das células endoteliais impossibilita o rearranjo do citoesqueleto que permite a transmigração das células de defesa (Hickey et al., 2008).

Apesar de ter sido comprovada a necessidade da presença de uma infinidade de moléculas tóxicas para o desenvolvimento da patogênese desse agente, apenas a toxina teta, uma das exotoxinas secundárias, tem uma participação direta em infecções histotóxicas (Songer, 1996; Hickey et al., 2008). O gene (*pfoA*) tem localização cromossomal e codifica a expressão dessa proteína que é uma citolisina dependente de colesterol. Embora a toxina teta, também conhecida como perfringolisina O, seja capaz de modular a virulência de *C. perfringens* tipo A, sua presença não é essencial para causar necrose (Rood, 1998). Uma série de estudos comprovou que a agregação dessa proteína na membrana da célula do hospedeiro é indispensável para atividade hemolítica e colapso vascular. Além disso, ela contribui com o mecanismo de escape bacteriano frente aos fagossomos e inibe o mecanismo de citotoxicidade mediado por macrófagos (Hickey et al., 2008).

As mionecroses causadas por *C. perfringens* tipo A já foram descritas em diversas espécies de mamíferos como

elefante (Rahman et al., 2009), cavalos (Choi et al., 2003) e humanos. Apesar de ser um microrganismo amplamente disseminado, não existe significativo número de relatos quanto à natureza clínica da doença nem relatos sobre sua ocorrência em ruminantes.

2.6 *Clostridium sordellii*

Clostridium sordellii foi primeiramente isolado em 1922 por Alfredo Sordelli, um microbiologista argentino que denominou a bactéria de *Bacillus oedematis sporogenes* baseado na morfologia e na marcante quantidade de edema observados durante infecções. Desde 1928, o nome *C. sordellii* passou então a ser adotado. Trata-se de um bacilo anaeróbico, Gram-positivo, formador de esporos centrais, possuidor de flagelos petríqueos que quando cultivado em ágar sangue de carneiro formam colônias translúcidas a opacas com pequenas zonas beta hemolíticas (Aldape et al., 2006).

Essa bactéria é comumente encontrada no solo e no intestino de animais e humanos, mas a maior parte das cepas não são patogênicas e as que são virulentas determinam infecções, como enterites e mionecroses letais em diversas espécies de animais. As infecções causadas apresentam taxa de mortalidade superior a 70% (Kachman et al., 2010) e correspondem a 4% das mionecroses causadas por clostrídios em humanos (Geny et al., 2007). Os sinais clínicos incluem fraqueza, edema local ou generalizado, hemoconcentração severa, levando a hipotensão, e leucopenia marcante com a morte ocorrendo rapidamente após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Aldape et al., 2010). Quando comparada a infecção causada por *C. perfringens*, os animais acometidos por *C. sordellii* tendem a apresentar lesões menos disseminadas e doloridas com dano vascular e hemólise também reduzidos (Cunniffe, 1996).

Além da gangrena gasosa, este agente tem sido freqüentemente incriminado como principal responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos. Essa enfermidade acomete indivíduos

aparentemente saudáveis que passam subitamente a apresentar náusea, fraqueza, vômitos, hipotensão progressiva refratária a tratamentos, edema local e/ou disseminado, hemoconcentração grave e marcante leucocitose na ausência de febre. Os grupos possivelmente afetados incluem: parturientes, casos de abortos (naturais ou induzidos), usuários de drogas endovenosas ou trauma recente (Aronoff e Ballard, 2009).

A virulência dessa bactéria é atribuída a inúmeras exotoxinas, embora apenas duas, de origem cromossomal (Green et al., 1995), a toxina letal e a hemorrágica, são extensivamente estudadas. As demais exotoxinas incluem hemolisinas, neuroaminidases, DNases, colagenases e lisolecitinase (Tabela 3) (Aldape et al., 2006). A toxina letal (LT) e a hemorrágica (HT) são membros de um grupo de toxinas clostridiais denominado grandes toxinas clostridiais (Geny et al., 2007).

Tabela 3. Atividade das principais exotoxinas produzidas por *Clostridium sordellii*.

Toxinas produzidas por <i>C. sordellii</i>	Atividade
Toxina letal (LT)	Inibe as proteínas sinalizadoras Rac, Cdc42, Ras e Rap
Toxina Hemorrágica (HT)	Inibe as proteínas sinalizadoras Rac, Cdc42, e Rho
Hemolisina	Hemolisina colesterol dependente
Neuroaminidase	Clivagem do ácido siálico
Fosfolipase C	Hidrolisa a lecitina
DNase	Degeneração nuclear das células hospedeiras
Hialuronidase	Cliva o ácido hialurônico, aumentando a permeabilidade celular
Colagenase	Hidrolisa colágenos e gelatina

Fonte: Adaptado de Aldape et al (2006)

As toxinas LT e HT, têm cadeia única compostas por um domínio responsável pela ligação com os receptores de membrana (C-terminal), outro segmento hidrofóbico que permanece transmembrana (central) e um domínio catalítico com atividade enzimática (N-terminal). Ambas as toxinas catalisam a glicosilação de pequenas GTPases a partir da UDP glicose. No entanto, elas diferem quanto as GTPases alvos, sendo que a LT é específica para Rac Ras e Rap enquanto a HT para Rho Rac e Cdc 42 (Gerhard, 2004).

Essas toxinas têm uma ação glicosiltransferase, utilizando UDP-glicose ou N-acetilglicosamina como co-substrato para modificar as GTPases que controlam o ciclo celular, apoptose, transcrição gênica e as funções estruturais da actina como morfologia celular, migração e polaridade (Aldape et al., 2006). Conseqüentemente, as modificações induzidas causam condensação da actina, culminando com a desorganização do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (Figura 2) (Gerhard, 2004).

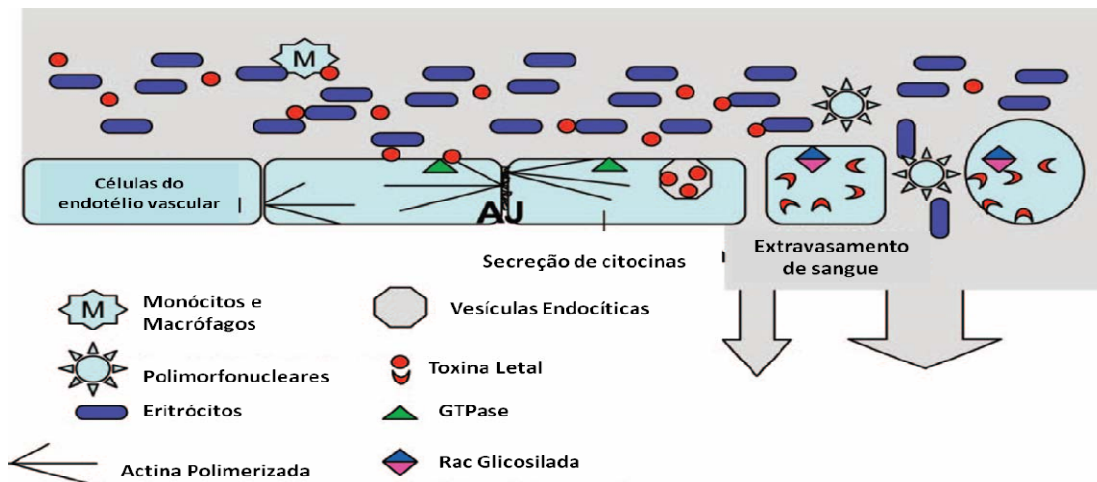


Figura 2. Mecanismo de ação da toxina letal de *Clostridium sordellii*. Após endocitose da toxina, o domínio N-terminal é translocado para o citosol onde promove a glicosilação da Rac e Ras que despolimerizam os citoesqueletos de actina, modificando as junções celulares (AJ). Adaptado de Geny et al (2007)

A LT, também chamada toxina produtora de edema, é a principal responsável pelo curso fatal da doença e estima-se que sua dose letal seja de 5 ng/ animal. Trata-se de uma das toxinas produzidas por clostrídios com peso molecular superior a 200 KDa (260 KDa), que se injetada intradermicamente em camundongos, causa rápida morte dos animais, atingindo preferencialmente o sistema cardiovascular (Geny et al., 2007). Dentre as diversas exotoxinas produzidas, apenas as cepas que não possuem o gene que codifica a LT deixam de ser letais quando inoculadas em camundongos (Kachman et al., 2010). Além dos danos teciduais, normalmente documentados na literatura, camundongos experimentalmente inoculados com LT também apresentam alterações nos parâmetros hematológicos como: aumento na contagem de células vermelhas, no hematócrito, granulócitos e monócitos e diminuição na contagem de plaquetas (Geny et al., 2007).

A LT produzida por *C. sordellii* é química e imunologicamente muito semelhante à toxina B de *C. difficile*, apresentando uma identidade de aproximadamente 76% e apenas algumas diferenças estruturais entre essas duas proteínas tóxicas determinam atividades celulares e sub-celulares

diferentes (Green et al., 1995). Por isso mesmo, essas toxinas apresentam reações imunológicas cruzadas, ou seja, anticorpos dirigidos contra a toxina LT de *C. sordellii* neutralizam a toxina B de *C. difficile* e vice versa (Cunniffe, 1996).

A HT foi primeiramente purificada por Martinez e Wilkins (1988). Esses pesquisadores demonstraram ser uma proteína com aproximadamente 300 KDa que apresentava atividades citotóxica, enterotóxica e letal. Produzida em pequenas quantidades pela maioria das cepas de *C. sordellii*, essa toxina é neutralizada por anticorpos anti-toxina A de *C. difficile*. No entanto, quando camundongos são inoculados com conteúdos tóxicos de *C. sordellii* adsorvidos em anti-toxina A de *C. difficile* a atividade letal fica apenas parcialmente reduzida, confirmando que a toxina LT é a mais potente das duas.

Embora as infecções causada por *C. sordellii* aconteçam na ausência de febre, esse microrganismo, assim como dos demais clostrídios histotóxicos, são reconhecidos pelo TLR 2 e TLR 6 levando a uma produção significativa do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina um B (IL1B) que são pirógenos endógenos.

Não se sabe exatamente o mecanismo que torna a infecção afebril, mas esse estado não pode ser atribuído a uma falha no sistema imune inato (Aldape et al., 2010).

As informações a cerca do tratamento são escassas e, em geral, compreendem debridamento dos tecidos afetados, antibiótico terapia sistêmica e, alguns estudos, demonstraram que a administração de antitoxina LT tem grande contribuição terapêutica. No entanto, o tempo entre aparecimento dos primeiros sinais e morte é tão rápido que o tempo para instaurar qualquer tipo de tratamento é ínfimo (Aronoff e Ballard, 2009). Assim como a maioria dos clostrídios, *C. sordellii* são susceptíveis aos antibióticos beta-lactâmicos, clindamicina, e cloranfenicol, mas resistentes aos aminoglicosídeos, sulfonamidas (Aldape et al., 2006) e tetraciclina (Sasaki et al, 2001). A profilaxia dessa enfermidade deve ser baseada na imunização dos animais com toxóides que contenham tanto a toxina LT como HT, pois animais imunizados com somente uma das duas toxinas sucumbem ao desafio com cepas que codificam as duas proteínas (Aminomoto et al., 2001).

2.7 Considerações sobre imuno-histoquímica

A técnica da imuno-histoquímica (IHQ) é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa humana desde 1970, porém o uso na medicina veterinária é relativamente recente, principalmente com a finalidade de diagnóstico infeccioso e oncológico (Ruiz et al., 2005). A IHQ utiliza como material, amostras de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina e que são, portanto, viáveis para o diagnóstico e pesquisa por longos períodos de tempo, embora não se saiba exatamente por quanto tempo (Bertheau et al., 1998).

Trata-se de uma técnica simples baseada em três entidades científicas: imunologia, histologia e química. O objetivo da IHQ é demonstrar a presença de antígenos em cortes de tecido por meio da utilização de

anticorpos específicos, uma vez que, antígeno-anticorpo ligam-se covalentemente e acontece uma reação química, com precipitação de cromógenos visíveis por microscopia de luz. Embora conceitualmente simples, a metodologia de IHQ tornou-se mais complexa à medida que metas mais rigorosas de sensibilidade e especificidade foram estabelecidas. Atualmente, os métodos são extremamente sensíveis e disponíveis para detectar um ou vários antígenos simultaneamente ou mesmo de examinar centenas de tecidos na mesma seção para a presença de um antígeno particular (Ramos-Vara et al., 2005).

O aumento no número de antígenos para os quais a IHQ está agora disponível, foi provocado por vários fatores: (a) os avanços na tecnologia produtora de toxinas e proteínas, incluindo métodos de identificação, purificação e produção de proteínas recombinantes para isolar ou fabricar tanto antígenos imunogênicos como anticorpos para reconhecer especificamente o patógeno de interesse, (b) o desenvolvimento de adjuvantes para facilitar a resposta imune, desejada e (c) técnicas de produção de anticorpos monoclonais e policlonais, além de métodos de purificação cada vez mais específicos. A técnica pode ser didaticamente dividida em 4 passos: o primeiro incluindo todos os tratamentos anteriores a incubação com anticorpos primários, o segundo inclui as reações imunológicas propriamente ditas, o terceiro inclui as etapas necessárias para a visualização da reação antígeno anticorpo e o quarto, e último passo, a interpretação dos resultados (Ramos-Vara et al., 2008) (Figura 3).

A utilização das técnicas de IHQ teve início com a aplicação do método direto. Posteriormente foram avaliadas técnicas mais rápidas e eficientes como: método da peroxidase anti-peroxidase (PAP); método da avidina biotina; método do complexo avidina biotina peroxidase (ABC); método do complexo streptavidina-biotina marcada (LSAB) e método do polímero marcado (Figura 4) (Ramos-Vara et al., 2005).

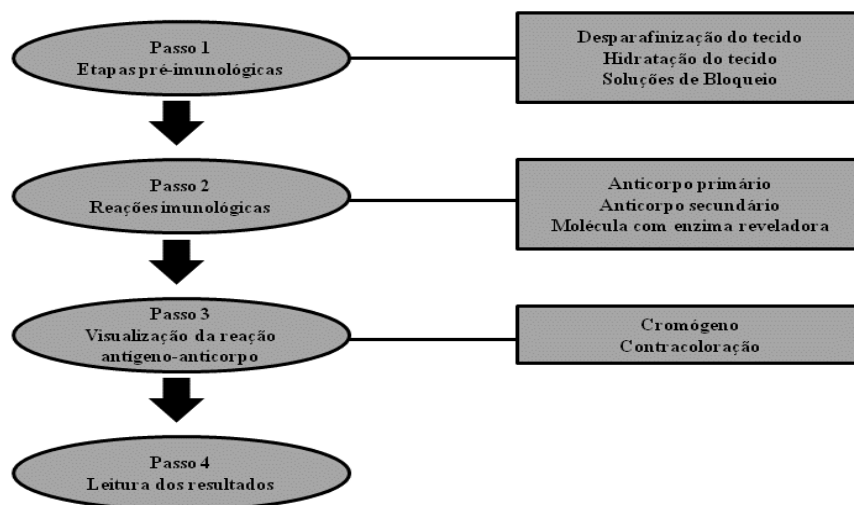


Figura 3. Etapas da Técnica de Imuno-histoquímica

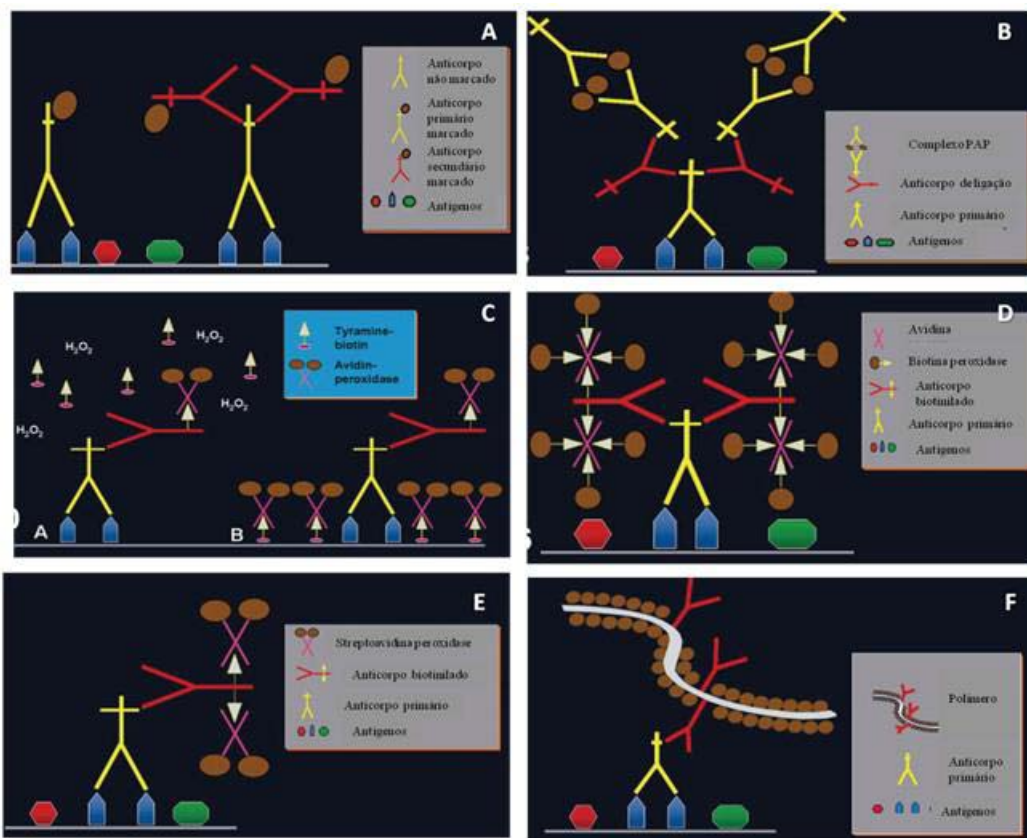


Figura 4. Técnicas de imuno-histoquímica

A: Método direto e indireto da imunoperoxidase; B: Método peroxidase antiperoxidase (PAP); C: Método de amplificação da tiramina; D: Método ABC; E: Método streptavidina peroxidase (LSAB); F: Método do polímero marcado. Adaptado de Ramos-Vara et al (2005). Adaptado de Ramos-Vara et al (2008).

A técnica LSAB possui grande vantagem em relação aos que utilizam moléculas de avidina, uma molécula que tem tendência a unir-se de forma inespecífica as membranas celulares, ácidos nucleicos e grânulos de mastócitos devido ao ponto isoelétrico. Este inconveniente tem sido contornado pela utilização da streptavidina, uma proteína do *Streptomyces avidinii*, que possui afinidade pela biotina equivalente a avidina da clara de ovo e menor tendência a unir-se a elementos celulares, devido ao fato de não ser glicosada e possuir um ponto isoelétrico próximo ao neutro, reduzindo a interação eletrostática com os elementos teciduais, só sendo superada pelo método do polímero marcado, que apresenta um custo consideravelmente mais elevado (Ramos-Vara, 2005).

2.8 Diagnóstico de clostrídios histotóxicos pela imuno-histoquímica

A primeira descrição do emprego a IHQ para detecção de clostrídios histotóxicos foi feita por Conesa et al (1995). Esses pesquisadores demonstraram ser possível a imunomarcagem de *C. chauvoei* em tecidos de ovinos fixados em formol e incluídos em parafina. Na ocasião, o anticorpo primário não era purificado e tinha sido obtido de coelhos, inoculados oito vezes, com bacterinas, por via endovenosa, a cada três dias. Os antígenos foram inoculados em dose crescente de 1 a 5 mL, nas cinco primeiras inoculações, persistindo a maior dose para as últimas três inoculações. Para obtenção de lâminas controle positivos, cinco animais foram inoculados com uma amostra toxigênica de *C. chauvoei* (ATCC 10092) misturadas em igual volume com uma solução estéril de cloreto de cálcio a 10%. Os animais foram sacrificados 18 horas após a inoculação quando já apresentavam sinais clínicos. Os controles negativos, por sua vez, foram obtidos por meio da obtenção de tecidos de animais inoculados apenas com o agente químico. A técnica empregada foi a PAP e a diluição de anticorpo primário padronizada foi de 1:400, sendo possível detectar o bastonete de maneira específica em todas as secções de músculos.

Devido ao sucesso da primeira tentativa, Vanelli e Uzal (1996) empregaram a mesma técnica e protocolo de IHQ (PAP), assim

como, o mesmo protocolo para obtenção de anticorpo primário não purificado para detectar *C. septicum* em tecidos de ovinos fixados em formol e incluídos em parafina. Os tecidos controle positivos foram obtidos por meio da inoculação de animais com cepas viáveis de *C. septicum* (ATCC 12464) misturada em igual volume a uma solução de cloreto de cálcio a 10% estéril. O sacrifício dos animais e obtenção de controle negativos foi feita conforme Conesa et al (1995). Os anticorpo produzidos por Vanelli e Uzal (1996), na diluição 1:1000, foram capazes de imunocorar especificamente os tecidos positivos.

A técnica LSAB foi primeiramente utilizada para detectar clostrídios histotóxicos por Assis et al (2005). Os pesquisadores inocularam cobaias com cepas de *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* para produção de controles positivos. A indução da doença nesses animais foi feita de maneira semelhante ao realizado por Conesa et al (1995) e Vanelli e Uzal (1996), porém a dose inoculada foi de 1 mL, sendo metade de cultura e a outra metade de cloreto de cálcio 10%. Houve um aprimoramento quanto a produção e obtenção de anticorpos primários. Os mesmos foram produzidos utilizando-se protocolos que prescreviam a inoculação subcutânea de bacterinas emulsionadas em adjuvantes oleosos, eram mais longos e o soro hiperimune assim obtido foi purificado por precipitação e passagem em coluna de cromatografia de troca iônica. Com isso, a técnica tornou-se mais refinada, abrangeu uma maior variedade de agentes e foi bastante eficiente na detecção desses clostrídios em espécimes clínicos incluídos em parafina.

Guarner et al (2006) também descrevem uma IHQ utilizando a técnica LSAB para detecção de clostrídios. Ao contrário de todos os pesquisadores anteriormente citados, esses utilizaram anticorpos comerciais dirigidos contra mais de uma espécie de clostrídio (*C. difficile*, *C. novyi*, *C. sordellii* e *C. perfringens*). Foi feito um estudo retrospectivo a partir de tecidos obtidos de 20 usuários de drogas que morreram após apresentarem sintomatologia clínica compatível com gangrena gasosa. De maneira semelhante,

foi possível imunomarcas as bactérias, mas, evidentemente, não foi possível dizer com precisão a espécie de clostrídio identificada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios e no Laboratório de Histopatologia, ambos situados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), e no setor de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

3.2 Animais utilizados

Foram utilizados 15 coelhos, fêmeas, da raça Nova Zelândia, com peso inicial entre 2,5 e 3 Kg, para a produção de soro hiperimune. Os coelhos foram adquiridos e alojados, em gaiolas suspensas, na fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa em Igarapé, Minas Gerais, e receberam arraçoamento apropriado e água a vontade.

Foram também utilizados 48 cobaias (*Cavia porcellus*), da linhagem English Short Ear, de ambos os sexos, pesando entre 350 a 500g cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/ Pedro Leopoldo-MG). Esses cobaios foram mantidos em cubas plásticas, com piso coberto por maravalha, e receberam arraçoamento adequado, suplementação semanal com capim colômbio e água a vontade.

3.3 Cepas de referências de bactérias do gênero *Clostridium*

Para inoculação de cobaios susceptíveis e produção de soro hiperimune foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC)² de *C. septicum* (ATCC 12464), *C. chauvoei* (ATCC 10092), *C. novyi* tipo A (ATCC 19402), *C. perfringens* tipo A (ATCC 13124) e *C. sordellii* (ATCC 9714) pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG.

As cepas foram reconstituídas em caldo *Brain heart infusion* (BHI)³ e após 24 horas de incubação, em jarra de anaerobiose⁴,

contendo mistura gasosa (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), a 37°C, semeadas em tubos de ensaio com tampa rosca contendo BHI e em duas placas com ágar sangue (AS) de carneiro a 5%. Os tubos e uma das placas foram incubados em anaerobiose a 37°C por 24 horas. A outra placa foi deixada em aerobiose para avaliação da pureza das cepas. As colônias foram avaliadas visualmente e pelo método de Gram quanto a morfologia e pureza.

3.4 Produção de soro hiperimune anti-*Clostridium septicum*, anti-*C. chauvoei*, anti-*C. novyi* tipo A, anti-*C. perfringens* tipo A e anti-*C. sordellii*

Após constatação das formas vegetativas e pureza das cepas bacterianas, as mesmas foram semeadas em 500 mL de BHI e incubadas em jarra de anaerobiose, contendo mistura gasosa (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), a 37°C por 24 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 5000 x g, a 4°C, durante 30 minutos, e o sobrenadante descartado. Os precipitados foram ressuspensos em solução estéril de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 com 0,5% de formol. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes e após a última centrifugação o precipitado foi ressuspensado em PBS a uma turbidez equivalente ao tubo sete da escala de Mac Farland, com concentração aproximada de 2,1 x 10⁹ células/ mL, e foram mantidas sob agitação constante, *overnight*. Posteriormente, para controle da inativação e esterilidade, uma alíquota da amostra foi semeada em um tubo com tampa rosca contendo BHI e em duas placas de AS mantidas em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 48 horas (Assis et al., 2001).

Confirmada a inativação bacteriana e esterilidade da suspensão, as bacterinas foram emulsionadas (Sorvall Omini-mixer 17106)⁵, na proporção 1:2, com adjuvante⁶ completo e incompleto de Freund para a primeira e demais inoculações, respectivamente.

² NIBISC, Inglaterra.

³ Difco Laboratories, EUA

⁴ Oxoide, Inglaterra

⁵ Sorvall, EUA

⁶ Sigma-Aldrich, EUA

Foram utilizados três coelhos por cepa bacteriana e o volume inoculado por animal/dia foi de 1 mL, sendo realizada duas inoculações subcutâneas de 0,5 mL cada. As aplicações foram feitas nos dias 0, 28,

49, 70 e 91, sendo a sangria realizada no dia 105 (Figura 5). Suspensões bacterianas não emulsionadas foram mantidas a 4°C para serem utilizadas como antígeno na titulação de anticorpos.

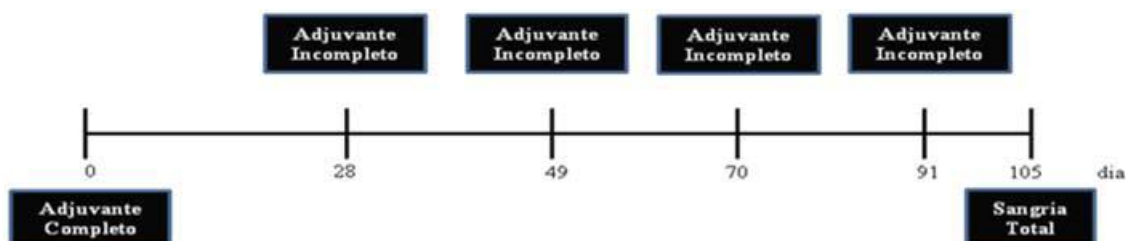


Figura 5. Protocolo de inoculação para obtenção de soro hiperimune de coelhos contra *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium sordellii*.

Nos dias de inoculação foram realizadas sangrias por punção da veia marginal da orelha, de cada coelho, para determinar a presença de anticorpos específicos pelo método de aglutinação em placa conforme descrito por Pinto e Abreu (1992). O sangue obtido foi mantido em temperatura ambiente, por duas horas, para coagulação e, para a retração do coágulo, o mesmo foi mantido entre 2 e 8°C *overnight*. Após esse período o sangue coletado foi centrifugado a 1.500 x g durante 20 minutos e mantidos a -20°C até o uso.

3.5 Obtenção das Imunoglobulinas

A purificação das imunoglobulinas G dos soros hiperimunes de coelhos foi realizada por meio de uma cromatografia de afinidade em coluna de proteína G sepharose (HiTrap Protein G HP)⁷. Para isso, 1 mL de soro foi diluído em igual volume de uma solução tampão de Tris-HCl 0,1 M pH 7,4, filtrado em membrana de 0,22 µm⁸ e adsorvido na coluna de afinidade previamente equilibrada com o mesmo tampão com concentrações iguais em que o anticorpo foi diluído. Em seguida, a coluna foi lavada com o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 até que três alíquotas consecutivas, de 1 mL, não apresentassem efluentes no lavado (absorbância < 0,050 a 280nm)⁹. As imunoglobulinas G foram então eluídas (Elution Buffer, Immunopure Gentle

Ag/Ab)¹⁰ e posteriormente dialisadas em Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 *overnight*. O material dialisado foi liofilizado e ressuspenso com o dobro do volume inicial de soro. Para verificar a eficiência do processo realizou-se dosagem protéica e eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970) do soro total, *pool* do lavado e do material ressuspenso. As IgG's obtidas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

3.6 Inoculação em cobaias, coleta e preparo das amostras de tecidos

Os 48 cobaias foram divididos em seis grupos de oito animais cada. O grupo controle foi inoculado, via intramuscular, com um mL de solução estéril de CaCl₂ a 5%. Esses cobaias foram observados por 48 horas quando, então, foram eutanasiados e necropsiados. Nos cobaias dos grupos experimentais foi feita uma inoculação intramuscular de uma solução contendo 0,5 mL de cultura centrifugada e ressuspenso com salina, para a turbidez do tubo oito da escala de Mac Farland, com concentração aproximada de 2,4 x 10⁹ células/ mL, e 0,5 mL de solução estéril de CaCl₂ a 10% (Tabela 4). Os cobaias foram observados até o óbito de um deles e os demais foram eutanasiados, com sobredose anestésica de pentobarbital sódico (90mg/Kg), e necropsiados.

⁷ GE Healthcare, EUA

⁸ Millipore, EUA

⁹ Ultrospec III Pharmacia, Inglaterra

¹⁰ Pierce, EUA

Tabela 4. Definição dos grupos experimentais de cobaias inoculadas com solução de CaCl₂ 5% e suspensões bacterianas de clostrídios histotóxicos com CaCl₂ 10%.

Grupo	Material Inoculado	Número de cobaios
Controle	CaCl ₂ 5%	8
1	<i>C. septicum</i> (ATCC 12464)	8
2	<i>C. chauvoei</i> (ATCC 10092)	8
3	<i>C. novyi</i> tipo A (ATCC 19402)	8
4	<i>C. perfringens</i> tipo A (ATCC 13124)	8
5	<i>C. sordellii</i> (ATCC 9714)	8
Total		48

De todos os cobaios, foram coletados amostras de tecido muscular do local de inoculação, coração, fígado, baço e rim. Esses tecidos foram fixados em formalina neutra tamponada durante 72 horas, e em seguida processados pelo método rotineiro de inclusão em parafina, cortados a cinco micrômetros de espessura e corados pela hematoxilina e eosina para posterior avaliação histológica em microscopia com luz comum (Luna, 1968). Todos os achados patológicos macroscópicos e microscópicos foram minuciosamente analisados buscando-se elucidar as principais alterações observadas na infecção promovida por *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*, bem como as possíveis diferenças entre eles.

3.7 Processamento do material para a técnica de imuno-histoquímica

Os blocos de parafina, destinados a padronização da técnica de IHQ, foram cortados a espessura de três micrômetros. Os cortes obtidos foram montados em lâminas do tipo *immunoslide* e incubados em estufa a 37°C até a sua utilização. Para imunomarcagem dos cortes histológicos, foi utilizada a técnica da estreptavidina biotina marcada (LSAB)¹¹ baseada na metodologia descrita por Assis et al (2005), com algumas modificações.

As lâminas contendo seções histológicas de cobaias inoculados com as cepas dos clostrídios e dos cobaios do grupo controle foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e soro albumina bovina a 10% (p/v), em câmara úmida, a 37°C durante 30 e 15 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e de aderências inespecíficas, respectivamente. Os cortes histológicos foram cobertos e incubados em câmara úmida, a 37°C durante 40 minutos com o anticorpo primário. A seguir, foram cobertos com anticorpo anti-IgG de coelho, biotilado, e incubados nas mesmas condições de umidade e temperatura por 30 minutos. Após esse processo, as lâminas foram expostas a estreptavidina conjugada com peroxidase durante 30 minutos. Essas etapas foram intercaladas com três lavagens em PBS de cinco minutos cada. Para revelação dos complexos imunes, foi utilizado o cromógeno 3,3 tetrahydrocloroeto diaminobenzidina- DAB¹².

O tempo de imunomarcagem foi determinado pela avaliação visual da marcação das lâminas cobertas com metade da concentração de anticorpos padronizadas, o qual variou de um a quatro minutos. Os cortes histológicos foram então contracorados com hematoxilina de Harris (Luna, 1968) por 20 segundos e visualizados ao microscópio de luz comum. Considerou-se controle negativo lâminas obtidas a partir do tecido muscular correspondente a área de inoculação dos

¹¹ Dako, EUA

¹² Dako, EUA.

cobaios do grupo controle (inoculados apenas com CaCl₂ 5%).

3.8 Diluição de trabalho do anticorpo primário

Para determinar a sensibilidade dos anticorpos primários nos cortes histológicos dos cobaios inoculados foram utilizadas as seguintes diluições: 1:10, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000 e 1:8.000. Foi selecionada a mais alta diluição que permitiu a melhor imunomarcagem dos antígenos com coloração de fundo inexpressiva. Uma vez determinada a sensibilidade, a especificidade foi avaliada aplicando-se os soros na diluição eleita em seções positivas de clostrídios não homólogos ao soro teste. O teste de reatividade negativa do anticorpo primário foi feito substituindo-se a etapa de incubação do anticorpo primário pela incubação com PBS.

3.9 Estudo retrospectivo de mionecrose a partir do material com diagnóstico clínico de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa realizados entre os anos de 2000 e 2010 no Mato Grosso do Sul

O diagnóstico retrospectivo histopatológico e etiológico de mionecroses, possivelmente causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, foi feito em material de ruminantes enviados pelo Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Considerou-se como critério de inclusão animais que tivessem morrido entre 2000 e 2010, com sinais clínicos e patológicos compatíveis com o

quadro de mionecroses. Os materiais selecionados foram cortados a espessura de três micrômetros. Os cortes obtidos foram montados em lâminas do tipo *immunoslide* e incubados em estufa a 37°C até o momento do processamento. Para imunomarcagem dos cortes histológicos, foi utilizada a técnica de IHQ descrita no item 3.7. Também foram obtidos cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina para posterior avaliação em microscopia com luz comum, para o diagnóstico histopatológico.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo e caracterização das cepas bacterianas de clostrídios histotóxicos

As cepas de *C. septicum* (ATCC 12464), *C. chauvoei* (ATCC 10092), *C. novyi* tipo A (ATCC 19402), *C. perfringens* tipo A (ATCC 13124) e *C. sordellii* (ATCC 9714), encontravam-se puras. O crescimento bacteriano exponencial obtido após a reconstituição das cepas liofilizadas demonstra que este método é uma maneira eficaz de conservar as bactérias, mantendo viável a expressão de fatores tóxicos, a patogenicidade e imunogenicidade das mesmas. Quando semeadas em placas de ágar sangue de carneiro, sob condições de anaerobiose, as colônias observadas eram compatíveis com a morfologia descrita pela literatura (Quinn et al., 2005). Não houve crescimento na placa, deixada em aerobiose e a avaliação das colônias, pelo método de Gram revelou apenas bastonetes Gram positivos, com morfologia compatível com as espécies analisadas (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização das cepas de referência de clostrídios histotóxicos quanto a morfologia das colônias obtidas em ágar sangue e pela coloração de Gram.

Bactéria	Morfologia das colônias	Coloração Gram
<i>C. septicum</i>	Colônias hemolíticas e úmidas com crescimento disperso.	Bastonetes longos e filamentosos (formando grandes cadeias).
<i>C. chauvoei</i>	Colônias com larga e clara zona de hemólise.	Bacilos de tamanho médio com alguns mostrando endósporo em forma de limão.
<i>C. novyi</i> tipo A	Colônias grandes, irregulares e com grande zona de hemólise clara	Bacilos grandes com esporos ovais a cilíndricos, subterminais que formam uma ligeira protuberância na célula.
<i>C. perfringens</i> tipo A	Circulares, achatadas, acinzentadas e rodeadas por zona de dupla hemólise.	Bacilos grandes e largos.
<i>C. sordellii</i>	Colônias irregulares, translúcidas sem hemólise.	Bastonetes pequenos com esporos cilíndricos que não alteram o formato das células.

4.2 Produção de anticorpos anti-*Clostridium septicum*, anti-*C. chauvoei*, anti-*C. novyi* tipo A, anti- *C. perfringens* tipo A e anti-*C. sordellii* e purificação de imunoglobulinas G

A inoculação de coelhos com suspensões de bactérias inativadas emulsionadas com adjuvantes completo de Freund mostraram-se eficientes para obtenção de soro

hiperimune, porém originaram severas lesões nas áreas ao redor da inoculação. Conforme observado, o título de anticorpos aglutinantes foi crescente em todos os grupos de coelhos inoculados com bacterinas de clostrídios histotóxicos. Os títulos foram nulos na primeira sangria e variaram de 0 a 1:100.000 entre a segunda a sétima sangria respectivamente (Figura 6).

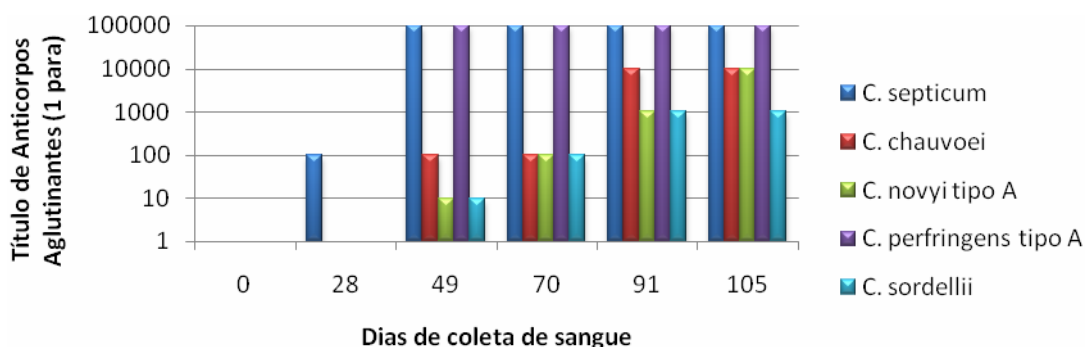


Figura 6. Título de anticorpos aglutinante frente ao *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium sordellii*.

Não foram detectados títulos de anticorpos aglutinantes, na segunda sangria (dia 28), para quatro dos cinco antígenos inoculados. Para *C. septicum*, o único cuja resposta primária persistiu por um período igual a 28 dias, a quantidade de anticorpos detectáveis foi relativamente pequena (título de 1:100). A segunda inoculação elicitou uma resposta secundária bastante efetiva contra *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A (dia 49), atingindo um platô de 1:100.000, que foi mantido até a última coleta. Para os demais antígenos a resposta foi aumentando gradativamente. Reações cruzadas não foram observadas entre os anticorpos

avaliados quando os mesmos foram testados por aglutinação.

A técnica de purificação das imunoglobulinas por meio da cromatografia de afinidade mostrou-se eficiente. As concentrações de imunoglobulinas obtidas a partir de 1mL de soro hiperimune, assim como o título de anticorpos aglutinantes, variaram conforme o antígeno inoculado (Tabela 6). A pureza das proteínas obtidas foi confirmada por meio de um gel de SDS-page, sendo detectado apenas uma proteína com aproximadamente 180 KDa.

Tabela 6. Dosagem protéica do soro hiperimune total e da alíquota precipitada de imunoglobulinas G de coelhos inoculados com *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium sordellii*.

Material	Dosagem protéica (mg/mL)				
	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. novyi</i> tipo A	<i>C. perfringens</i> tipo A	<i>C. sordellii</i>
Soro total	78	73,5	70,9	71,8	74,5
Liofilizado	16,9	14,8	6,4	10,1	10,4

4.3 Descrição do curso clínico e alterações patológicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com clostrídios histotóxicos e nos grupos controles inoculados com CaCl₂ a 5%

Os cobaios do grupo controle, durante as 48 horas de observação, não apresentaram alterações significativas no comportamento. Todos estavam alertas e não houveram modificações no apetite ou locomoção, notou-se apenas uma leve sensibilidade dolorosa quando o membro inoculado com cloreto de cálcio era examinado. Com relação aos grupos infectados com as cepas de clostrídios histotóxicos, observou-se que todas as cepas inoculadas foram patogênicas para os cobaios. O aparecimento de sinais clínicos ocorreu cerca de duas horas após a inoculação intramuscular da solução de bactérias em estado vegetativo e CaCl₂ a 10%. Os cobaios apresentaram aumento de volume

do membro inoculado e acentuado desconforto. Passada algumas horas, os cobaios demonstravam dor no membro inoculado caracterizado por sensibilidade à palpação e dificuldade em apoiar o membro para se locomover. Os cobaios também estavam apáticos e a ingestão de água e alimentos foi reduzida, possivelmente devido a toxemia e dificuldade de locomoção. Com a progressão do quadro, quatro horas após a inoculação, apesar de manterem-se alertas os cobaios não conseguiam locomover-se mediante estímulos e quando andavam demonstravam dor. O tempo entre inoculação e morte do primeiro animal, assim como, as lesões observadas no membro inoculado variaram entre os grupos experimentais, conforme demonstrado na tabela 7. O grupo de cobaios inoculados com *C. septicum* apresentou o menor período entre aparecimento dos primeiros sinais clínicos e morte, enquanto os cobaios inoculados com *C. chauvoei* apresentaram o

maior tempo entre inoculação e morte do primeiro animal.

Tabela 7. Tempo entre inoculação e morte do primeiro cobaio dos grupos experimentalmente inoculados com cepas de referência de clostrídios histotóxicos.

Grupo experimental	Tempo entre inoculação e morte (h)
Grupo controle negativo	48
<i>Clostridium septicum</i>	08
<i>Clostridium chauvoei</i>	31
<i>Clostridium novyi</i> tipo A	17
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	20
<i>Clostridium sordellii</i>	21

4.4 Descrição das alterações macroscópicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com CaCl₂ a 10% e com clostrídios histotóxicos.

À necropsia dos cobaios do grupo controle, somente o membro inoculado apresentava-se levemente edemaciado e com discreto edema subcutâneo, sem, no entanto, haver alterações significativas no volume. Observou-se discreta alteração na perfusão vascular com petéquias, equimoses e sulfusões focais e restritas ao músculo inoculado (figura 7).

Os cobaios inoculados com *C. septicum* (Grupo 1) apresentaram acentuado aumento de volume da coxa, perna e pata correspondentes ao lado de inoculação. À palpação, o membro pélvico inoculado encontrava-se crepitante, aumentado de volume e com a pele tensionada (indicando intensa quantidade de gás). A pele do membro inoculado e das regiões adjacentes (inguinal, abdominal e torácica ventral) estava difusamente vermelha, com equimoses (indicando hiperemia e hemorragia). Ao corte observou-se extravasamento de líquido vermelho intenso (edema e hemorragia) com bolhas de gás e intensa hemorragia do subcutâneo. As

fâscias dos músculos da coxa estavam separadas pela intensa quantidade de gás. A musculatura do membro inoculado (semimembrâneo, adutor, vasto medial, reto da coxa, semitendinoso, gastrocnêmio, sartório, grácil e glúteos) apresentava-se intensamente hemorrágica, enfisematosa e com áreas cinza (indicativas de necrose). O músculo inoculado de um dos cobaios flutuou quando colocado no formol confirmando intensa presença de gás. As alterações também foram observadas nos músculos mediais da coxa (reto da coxa e vasto medial), glúteos e região inguinal. No subcutâneo e na musculatura da região abdominal ventral observou-se intensa hemorragia e edema com áreas acinzentadas inclusive no lado oposto ao inoculado. Foi possível observar petéquias, equimoses e sulfusões no peritônio e pleura parietal. Houve acúmulo de 2-3 mL de líquido hemorrágico na cavidade peritoneal. Na região torácica ventral observou-se intensa hemorragia e edema com áreas acinzentadas nos músculos costais estendendo-se em direção a escápula em ambos os lados.

Os cobaios inoculados com *C. chauvoei* (Grupo 2) apresentaram moderado aumento de volume e crepitação da coxa, perna e pata. A pele do membro posterior e da região abdominal ventral, até a altura do esterno, apresentava-se intensa e difusamente vermelho-amarronzadas, os pêlos e pele desprendiam-se facilmente. Ao corte e a palpação, a região inoculada estava crepitante, bem como se detectou a saída de gás com odor butírico e discreto extravasamento de fluido levemente avermelhado. Observou-se também edema subcutâneo e hemorragia da pata, perna e coxa, estendendo-se para toda a parte ventral do abdome e tórax principalmente no lado no qual o animal foi inoculado. As fâscias e os feixes musculares apresentavam-se distendidos e separados devido a presença de gases. Os músculos superficiais da região medial da perna (extensor longo do dedo, tibial cranial, flexor longo e profundo do dedo), coxa (vasto lateral, reto da coxa e vasto medial) e glútea (glúteo superficial, médio e profundo) apresentavam cor vermelho-escura

tendendo ao preto (indicando forte hemorragia local). Tanto os músculos superficiais quanto os profundos da região anterolateral da coxa e perna, ou seja, lado oposto ao da inoculação apresentava tonalidade acinzentada (indicando necrose muscular). Também foram observadas na musculatura abdominal e costal ventral, áreas focais de hemorragia e necrose, mas essas eram mais significativas no lado correspondente a inoculação. O peritônio apresentou petéquias focais distribuídas difusamente.

Os cobaios inoculados com *C. novyi* tipo A (Grupo 3) apresentaram acentuado aumento de volume da pata, coxa, glúteos e região inguinal. A palpação percebeu-se que a pele do membro posterior inoculado estava tensionada e estirada (devido à intensa quantidade de gás presente). Ainda no mesmo membro, a pele da perna e coxa apresentava-se difusamente hiperêmicas com algumas áreas vermelho-escuras tendendo ao preto. Na coxa e região inguinal de alguns dos cobaios, observaram-se bolhas com conteúdo líquido sanguinolento (provavelmente devido ao edema e hemorragia). Foram observados pêlos tingidos de sangue e falhas na pele, correspondentes a erosões ou ulcerações (possivelmente decorrentes do rompimento das bolhas com conseqüente rompimento da epiderme). Ao corte, observou-se quantidade moderada de edema hemorrágico que estava difusamente distribuído por todo o tecido subcutâneo. Os músculos do membro inoculado, como os superficiais do quadril (tensor da fáscia lata, glúteo superficial, médio, acessório e profundo), coxa (bíceps da coxa, semitendíneo, semimembranáceo, sartório e grácil) e perna (extensor longo do dedo, tibial cranial, flexor longo e profundo do dedo), apresentavam-se moderadamente hemorrágicos, por vezes acinzentados (necróticos) e crepitantes. As fâscias estavam separadas devido a intensa presença de gás. Assim como o edema, a hemorragia e necrose muscular estenderam-se por toda a musculatura ventral do animal.

Os cobaios inoculados com *C. perfringens* tipo A (Grupo 4) apresentaram aumento de volume da pata, coxa, glúteos e região inguinal. À palpação, todo o membro posterior direito encontrava-se crepitante e aumentado de volume (indicando presença de gás e edema no membro inoculado). A pele da perna e coxa apresentava-se difusamente azul-esverdeadas (pseudomelanose "in vivo") e, em alguns cobaios, observaram-se elevações da epiderme com conteúdo líquido translúcido. Além dessas bolhas foram vistas falhas na pele (ulcerações) e pêlos tingidos por sangue (possivelmente decorrentes do rompimento das mesmas). Ao corte percebeu-se desprendimento de gás de odor pútrido e extravasamento de grande quantidade de líquido hemorrágico, viscoso e untuoso (gordura). O edema do subcutâneo estendeu-se da coxa até a região toraco-abdominal ventral. A musculatura cranial da coxa (quadríceps, reto, vasto lateral, medial e intermédio), região oposta a inoculação, estava com aspecto liquefeito (necrose de liquefação), e desfazia-se facilmente ao corte. A musculatura posterior da coxa direita apresentava-se vermelho-escura com áreas multifocais preto-esverdeadas a acinzentadas (indicativas de necrose). As fâscias e os feixes musculares estavam separados por espaços bem delimitados (intensa quantidade de gás).

Os cobaios inoculados com *C. sordellii* (Grupo 5) apresentaram aumento de volume da pata, coxa, glúteos e região inguinal. A palpação percebeu-se que a pele do membro posterior inoculado estava tensionada e estirada (devido à grande quantidade de gás presente). Ainda no mesmo membro, a pele da perna e coxa apresentava-se difusamente hiperêmicas com algumas áreas vermelho-escuras tendendo ao preto. Ao corte observou-se quantidade moderada de edema hemorrágico que estava difusamente distribuído por todo o tecido subcutâneo e havia também o extravasamento de gás fétido. Os músculos superficiais do quadril (tensor da fáscia lata, glúteo superficial, médio, acessório e profundo), coxa (bíceps da coxa, semitendíneo, semimembranáceo,

sartório e grácil) e perna (extensor longo do dedo, tibial cranial, flexor longo e profundo do dedo) do membro inoculado apresentavam-se hemorrágicos e por vezes necróticos e crepitantes. Tanto os músculos superficiais quanto os profundos da região anterolateral da coxa e perna, ou seja, lado oposto a inoculação, apresentavam tonalidade acinzentada (indicando necrose muscular). As fâscias e os feixes

musculares estavam separados (intensa presença de gás). Assim como o edema, a hemorragia e a necrose muscular estenderam-se por toda a musculatura ventral do animal.

As principais diferenças entre as lesões macroscópicas observadas nos cobaias experimentalmente inoculados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8. Comparação das alterações anatomo-patológicas observadas em cobaias inoculadas com clostrídios histotóxicos.

Observações Macroscópicas	Grupos					
	Controle	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Clostridium novyi</i> tipo A	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	<i>Clostridium sordellii</i>
Aumento de volume do membro inoculado	Discreto	Intenso	Moderado	Moderado	Intenso	Intenso
Cor do membro inoculado	Normal	Vermelho intenso	Vermelho escuro (preto)	Vermelho escuro (preto)	Azul esverdeada a cinza	Vermelho escuro (preto)
Bolhas e ulcerações na derme e/ou epiderme	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
Pseudomelanose "in vivo"	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Hemorragia, edema e necrose do membro inoculado e regiões adjacentes	Discreto	Intenso	Moderado	Moderado	Intenso	Intenso
Necrose de liquefação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intenso	Ausente
Hemorragia e edema do membro contralateral	Ausente	Intenso	Discreto	Discreto	Discreto	Intenso



Figura 7. Fotos dos cobaias inoculados experimentalmente com CaCl₂ a 10% e com as cepas de clostrídios histotóxicos.

A: Cobaia experimentalmente inoculado com *C. septicum*: acentuado aumento de volume do membro pélvico correspondente ao lado inoculado. A pele e tecido subcutâneo do membro inoculado e das regiões adjacentes (inguinal e abdominal) estão intensamente avermelhados e com acentuado edema subcutâneo.

B: Cobaia experimentalmente inoculado com *C. chauvoei*: Músculos do membro pélvico inoculado e tecido subcutâneo abdominais e torácicos vermelho-escuros e edemaciados.

C: Cobaia experimentalmente inoculado com *C. novyi* tipo A: Observam-se os músculos do membro pélvico inoculado vermelho-escuro e o tecido subcutâneo difusamente vermelho- ou cinza-escuros e edemaciado.

D: Cobaia experimentalmente inoculado com *C. perfringens* tipo A: Os músculos do local inoculado estão liquefeitos e há intensa quantidade de exsudato sanguinolento com material untuoso (tecido adiposo liquefeito).

E: Cobaia experimentalmente inoculado com *C. sordellii*: Ao corte observa-se edema moderado, os músculos da coxa e perna apresentavam-se vermelho-escuros e por vezes acinzentados caracterizando necrose.

F: Cobaias inoculada com CaCl₂: Observou-se equimoses e um foco vermelho-escuro restrito ao músculo inoculado.

4.5 Descrição das alterações histológicas observadas nos cobaios experimentalmente inoculados com CaCl₂ a 5% e com clostrídios histotóxicos.

À histologia dos cobaios do grupo controle possibilitou perceber que o agente químico inoculado foi capaz de promover necrose das fibras musculares na presença de

discreto infiltrado inflamatório neutrofílico. De maneira geral, a histologia dos demais grupos revelou uma miofibrilose neutrofílica aguda associada a diversos graus de degeneração, necrose e hemorragia (Figura 8). A histologia também demonstrou alterações semelhantes entre grupos, mas que além de diferirem quanto à intensidade apresentaram particularidades (Tabela 9).

Tabela 9. Diferenças quanto à intensidade e tipos de alterações histológicas observadas em cobaios experimentalmente infectados com clostrídios histotóxicos.

Histopatologia	Grupos					
	Controle	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Clostridium novyi</i> tipo A	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	<i>Clostridium sordellii</i>
Degeneração hialina das fibras musculares	Discreto	Intenso	Discreto	Discreto	Moderado	Discreta a moderada
Necrose flocular das fibras musculares	Discreto	Intenso	Intenso	Intenso	Moderado	Moderado a intenso
Necrose de liquefação	Ausente	Ausente	Ausente	Moderado	Intenso	Moderado
Necrose vascular com trombose	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Miocardite	Ausente	Discreto	Ausente	Discreto	Discreto	Ausente
Hemorragia	Discreto	Intenso	Leve a moderado	Moderado	Moderado	Discreta a moderada
Gás	Ausente	Discreto	Moderado	Moderada a intensa	Intenso	Intenso
Infiltrado inflamatório	Discreto	Intenso	Intenso	Discreto	Discreto	Discreto a moderado
Bacilos	Ausente	Intenso	Moderado	Intenso	Intenso	Intenso

A histopatologia dos cobaios inoculados com *C. septicum* (Grupo 1) revelou moderado infiltrado inflamatório composto principalmente por neutrófilos. Além disso, foi observado necrose do endotélio das vênulas com hemorragia na fáscia muscular estendendo-se para o interstício. As fibras musculares apresentavam-se difusamente tumefeitas, eosinofílicas, com perda de estriações (degeneração hialina), na presença de numerosos bacilos muitos deles aglomerados sobre elas.

A análise histopatológica dos cobaios inoculados com *C. chauvoei* (Grupo 2)

revelou presença de intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos e poucos macrófagos nas fáscias musculares. Foram observadas hemorragia leve a moderada, inclusive em áreas próximas as fibras musculares fragmentadas. As fibras musculares encontraram-se difusamente fragmentadas (necrose flocular). Os bacilos estavam difusamente distribuídos e presentes em quantidades moderadas a intensas.

Histologicamente os cobaios inoculados com *C. novyi* tipo A (Grupo 3) apresentaram necrose do endotélio das vênulas com

áreas de hemorragia moderada na ausência de bacilos. No tecido muscular foi observado infiltrado neutrofílico discreto e multifocal. As fibras musculares encontravam-se difusamente degeneradas com perda das estriações (degeneração hialiana) e fragmentadas (necrose flocular). As mesmas encontravam-se separadas de forma bem delimitada, possivelmente pela intensa presença de gás. Os bacilos encontravam-se em grande quantidade, principalmente nas fáscias e em áreas de necrose hialina e ou flocular com mínima ou nenhuma reação inflamatória. Áreas de necrose liquefativa das fibras musculares associadas a bacilos também foram observadas. Algumas fibras apresentaram acidofilia do citoplasma, fragmentação e picnose/cariólise nuclear.

A avaliação histológica dos cobaios inoculados com *C. perfringens* tipo A (Grupo 4) revelou necrose do endotélio das vênulas com moderada hemorragia e trombose. Moderada quantidade de infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos foram observados. Degeneração hialina e necrose flocular moderada foram multifocalmente observadas. Nas áreas com maior número de fibras necrosadas observaram-se hemorragia e infiltrados neutrofílico com pouco ou nenhum bacilo. No entanto, foram encontradas áreas com necrose de coagulação com mínima reação

inflamatória e numerosos bacilos curtos e espessos. Nessas áreas há fibras com acúmulo de bacilos no citoplasma parcialmente fragmentado.

Finalmente, a histopatologia dos cobaios inoculados com *C. sordellii* (Grupo 5) revelou discreta a moderada hemorragia, acompanhada por lise de hemácias. Da mesma maneira, o infiltrado neutrofílico, apesar de multifocal, foi discreto a moderado. Algumas vênulas apresentavam necrose endotelial. As fibras musculares encontravam-se separadas pela intensa presença de bolhas de gás. Em alguns campos esses espaços são circulares, com fibras e miofibrilas adjacentes comprimidas. Além disso, havia áreas focais de necrose de liquefação associada a presença de numerosos bacilos e mínima reação inflamatória.

À histologia dos demais órgãos foi possível observar que em todos os grupos houve pelo menos um animal que apresentou degeneração lipídica centrolobular, multifocal do fígado que variou de leve a moderada. Nos grupos 1, 3 e 4, foi possível observar alterações no miocárdio caracterizadas por áreas focais, próximas ao endocárdio, com hemorragia, discreta necrose das fibras e leve infiltrado neutrofílico, por vezes na presença de bacilos.

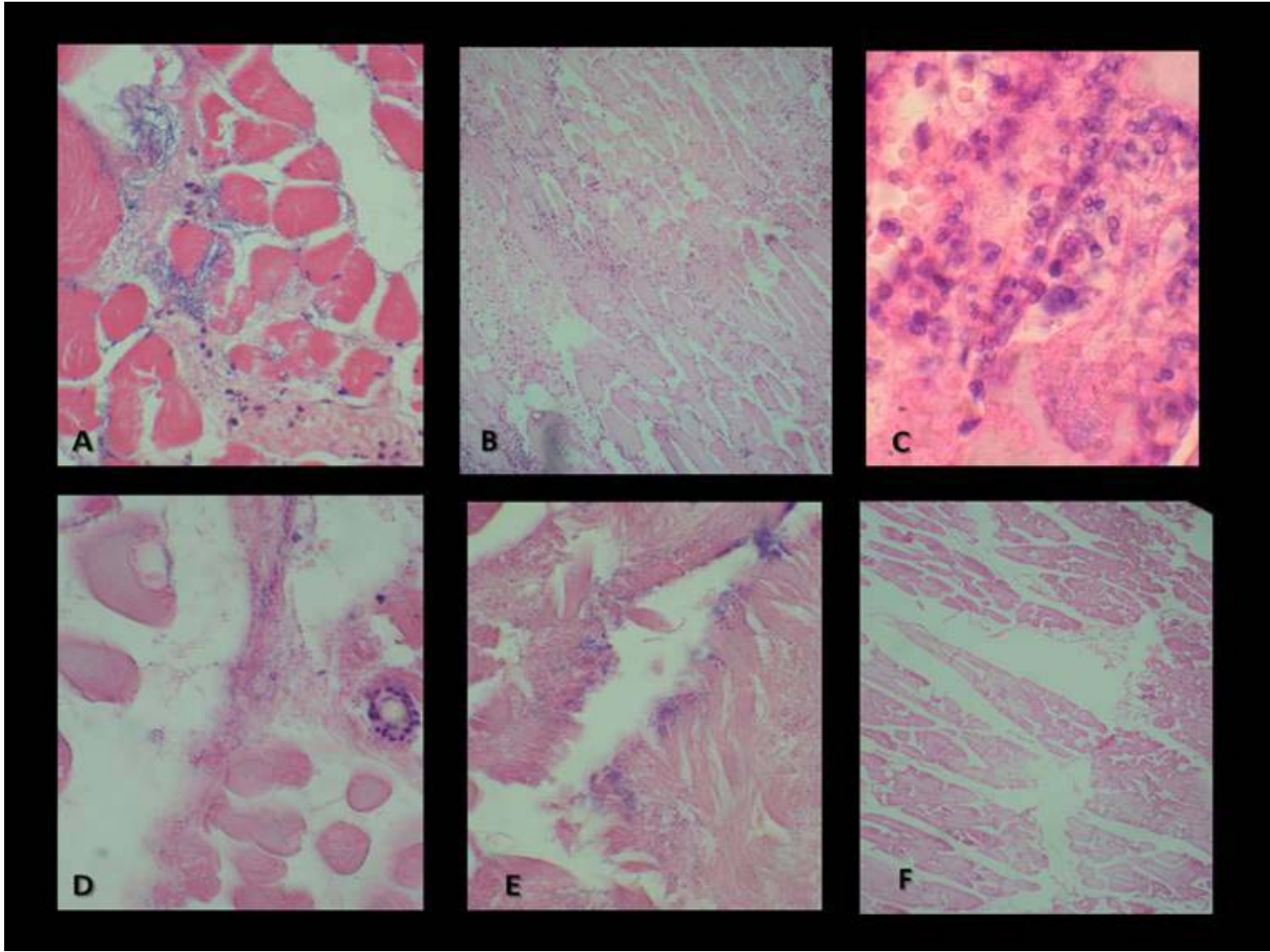


Figura 8. Histopatoloia do músculo da área de inoculação colhido de cobaios experimentalmente inoculados com CaCl₂ a 10% e com as amostras de clostrídios histotóxicos (Coloração de Hematoxilina e Eosina).

A: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. septicum*: Observa-se um espaço vazio, bem delimitado (gás) separando um feixe de fibras. As fibras musculares adjacentes apresentam degeneração hialina e necrose flocular associadas a numerosos bacilos grandes e poucas células inflamatórias (Objetiva 40).

B: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. chauvoei*: Fibras musculares necróticas (necrose flocular) associadas a acentuado infiltrado inflamatório neutrofílico, hemorragia e discreta presença de gás (Objetiva 40).

C: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. chauvoei*: Fibras musculares necróticas associadas a acentuado infiltrado inflamatório neutrofílico, edema e hemorragia com inúmeros pequenos bastonetes intralesionais (Objetiva 100).

D: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. perfringens* tipo A: Fibras musculares apresentando necrose hialina com grande espaço entre as mesmas (gás), associada a numerosos bastonetes curtos e edema moderado (Objetiva 40).

E: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. novyi* tipo A: Fibras musculares parcialmente liquefeitas associadas a numerosos bastonetes intralesionais (Objetiva 40).

F: Músculo esquelético do animal experimentalmente inoculado com *C. sordellii*: Fibras musculares fragmentadas associadas a leve infiltrado inflamatório, edema e hemorragia (Objetiva 40).

4.6 Imuno-histoquímica dos cobaios experimentalmente infectados com clostrídios histotóxicos.

As diluições e concentrações protéicas dos anticorpos primários por lâmina necessários para a realização da técnica LSAB padronizada encontram-se na tabela 10. Analisando as seções de músculo do local de inoculação dos cobaios experimentalmente inoculados coradas pela técnica LSAB, verificou-se que todos os clostrídios apresentaram o mesmo padrão de distribuição e a mesma intensidade de imunomarcção, porém foram visualizadas

quantidades variáveis de bastonetes nas seções, sendo maior para *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A e menores para *C. sordellii*, *C. novyi* tipo A e *C. chauvoei*. Os bastonetes foram encontrados de maneira difusa tanto no interstício quanto sobre as fibras necróticas e vasos (Figura 9). Não foram observadas reações cruzadas entre os anticorpos avaliados. Quando os anticorpos foram testados nos cortes de tecidos provenientes dos cobaios controle ou quando foram substituídos por PBS nenhuma marcação de bastonete foi observada.

Tabela 10. Diluição do anticorpo primário anti-*Clostridium septicum*, anti-*C. chauvoei*, anti-*C. novyi* tipo A, anti- *C. perfringens* tipo A e anti-*C. sordellii* e quantidade aproximada de proteínas por lâminas necessária para imuno-histoquímica.

Material	Anticorpo Primário				
	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. novyi</i> tipo A	<i>C. perfringens</i> tipo A	<i>C. sordellii</i>
Diluição	1:3.000	1:200	1:30	1:200	1:400
Proteína (µg)/Lâmina	0,57	7,4	21,2	5,0	2,6

Figura 9. Imuno-histoquímica (LSAB) dos cobaios inoculados experimentalmente com CaCl₂ a 10% e com as cepas de clostrídios histotóxicos

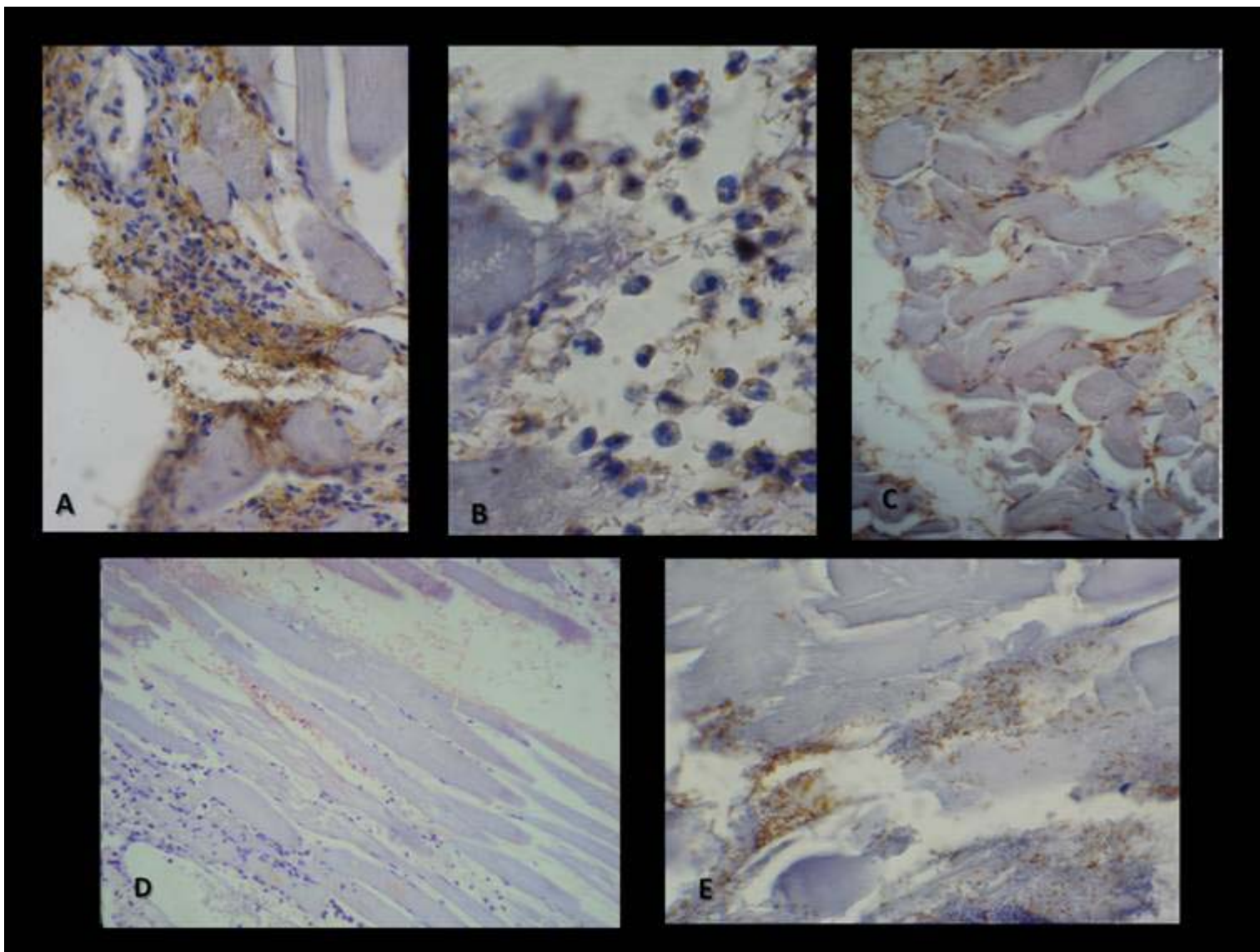
A: Músculo esquelético do cobaio experimentalmente inoculado com *C. septicum*: Numerosos bacilos com marcação positiva são observados entre as fibras necróticas e associado às células inflamatórias (Objetiva 40).

B: Músculo esquelético do cobaio experimentalmente inoculado com *C. chauvoei*: Fibras musculares necróticas associadas a um acentuado infiltrado inflamatório e bacilos pequenos marcados, alguns no citoplasma dos fagócitos (Objetiva 100).

C: Músculo esquelético do cobaio experimentalmente inoculado com *C. perfringens* tipo A: Fibras musculares tumefeitas e fragmentadas com grande espaço entre as mesmas associada a miríades de bastonetes curtos marcados (Objetiva 20).

D: Músculo esquelético do cobaio experimentalmente inoculado com *C. novyi* tipo A: Fibras musculares necróticas associadas a moderado infiltrado inflamatório e a pequenos bastonetes intralesionais com marcação positiva (Objetiva 40).

E: Músculo esquelético do cobaio experimentalmente inoculado com *C. sordellii*: Fibras musculares necróticas associadas a uma acentuada presença de bacilos intralesionais e sobre as fibras necróticas com marcação positiva (Objetiva 40).



4.7 Frequência, histopatologia e diagnóstico etiológico pela imunohistoquímica, empregando a técnica LSAB, em espécimes clínicos de ruminantes que morreram com suspeita de mionecroses possivelmente causadas pelos clostrídios histotóxicos entre os anos de 2000 e 2010 no Mato Grosso do Sul.

As amostras obtidas na UFMS eram compostas de material clínico oriundo de 28 bovinos (87,5%) e quatro ovinos (12,5%), perfazendo um total de 32 suspeitas. Entre 2000 e 2010, anos objetos de estudo, apenas em dois anos a UFMS não recebeu material com suspeita clínica de mionecrose (2001 e 2003). Nos demais anos, a demanda se manteve relativamente constante e em 2010 apresentou um crescimento acentuado (Figura 10).

Os espécimes clínicos foram coletados de ruminantes provenientes de 13 cidades do Mato Grosso do Sul e um do Mato Grosso, sendo três de Aquidauana (9,4%), quatro de Inocência (12,5%), um de São José do Rio Claro Mato Grosso (3,1%), dois de Terenos (6,2%), um de Nova Andradida (3,1%), dez de Campo Grande (31,3%), dois de Anastácio (6,3%), um de Angélica (3,1%), um de Jaraguari (3,1%), um de Água Clara (3,1%), um de Corumbá (3,1%), um de Ivinhema (3,1%), dois de Laguna Caarapã (6,2%), um de Bodoquena (3,1%) e um de Nioaque (3,1%). A idade dos animais variaram de sete a 36 meses para bovinos, com apenas um animal com idade não identificada e de cinco a 18 meses para ovinos. A distribuição percentual dos bovinos nas respectivas faixas etárias podem ser vistas na figura 11.

Os sinais clínicos observados, imediatamente anteriores a morte dos ruminantes, foram divididos em categorias: a) encontrados mortos ou morreram subitamente (n=4), b) mais de um animal do plantel morreu com sinais clínicos clássicos (n=13), c) apenas um animal morreu com sinais clínicos clássicos (n=6), d) o animal morreu com sinais clínicos não compatíveis

com mionecrose, embora a suspeita clínica fosse de mionecrose (n=5), e) morreram após manobra obstétrica (n=1), f) animais identificados apenas com perda de capacidade locomotora (n=2), e g) sintomatologia não informada com suspeita clínica de mionecrose (n=1). Dentre o material clínico disponível para histologia e IHQ a grande maioria era proveniente do músculo esquelético afetado (n=28), com apenas algumas amostras de músculo cardíaco (n=3) e fígado (n=1). Dos casos com suspeita clínica de mionecroses, apenas dois foram negativos, sendo um feito em músculo esquelético e o outro em tecido muscular cardíaco. Os demais foram positivos para um ou mais agentes (Figura 12).

A maioria dos casos foram positivos apenas para *C. chauvoei* (n=7), seguido de positivos apenas para *C. perfringens* tipo A (n=6). Os demais diagnósticos demonstraram associação de dois ou três agentes, sendo o mais comum a ocorrência de *C. septicum*, *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A (n=4), seguido de *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A (n=3); *C. septicum* e *C. chauvoei* (n=2); *C. chauvoei* e *C. sordellii* (n=2); *C. septicum*, *C. chauvoei* e *C. sordellii* (n=2); *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A (n=1); *C. chauvoei* e *C. novyi* tipo A (n=1), *C. septicum*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A (n=1) e *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A (n=1). Separando-se os quatro ovinos, diagnosticou-se a gangrena gasosa como sendo causada por, *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo A, *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A e *C. septicum*, *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A. Quando se estuda a frequência de cada um dos cinco clostrídios estudados, percebe-se que *C. chauvoei* foi o mais prevalente agente (73,3%) dentre as seções classificadas como positivas, seguido por *C. perfringens* tipo A (53,3%), *C. septicum* (33,3%), *C. sordellii* (13,3) e *C. novyi* tipo A (10%). Dois dos três tecidos de músculo cardíaco e o único tecido hepático, submetidos ao diagnóstico pela IHQ, empregando-se a técnica LSAB, foram positivos apenas para *C. chauvoei*.

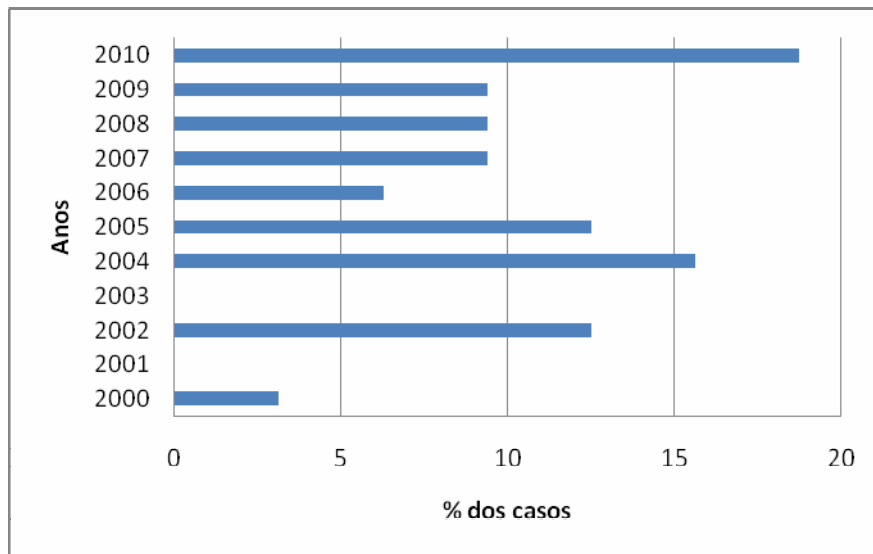


Figura 10. Distribuição dos casos de mionecrose em ruminantes, entre os anos de 2000 e 2010, recebidos pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

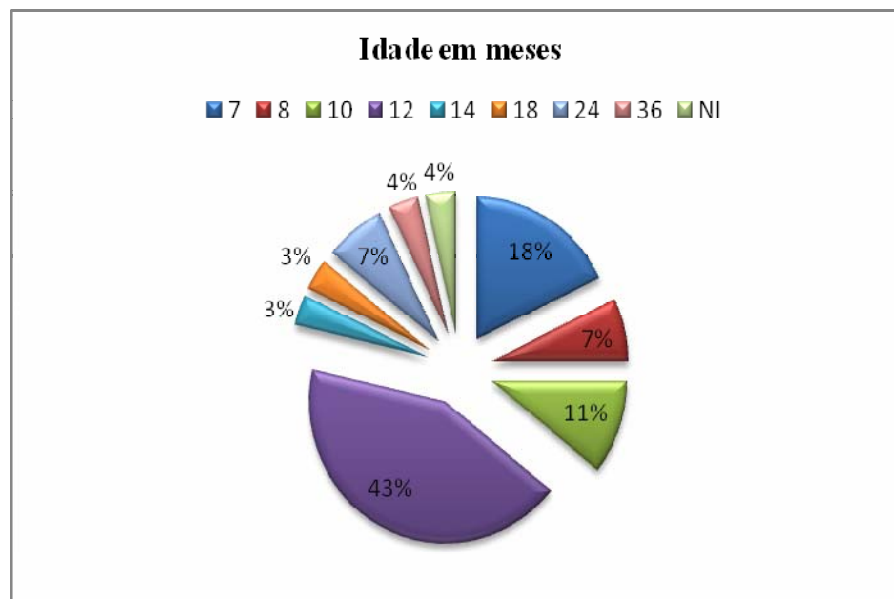


Figura 11. Idade dos bovinos que morreram com suspeita clínica de mionecrose entre os anos de 2000-2010 pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

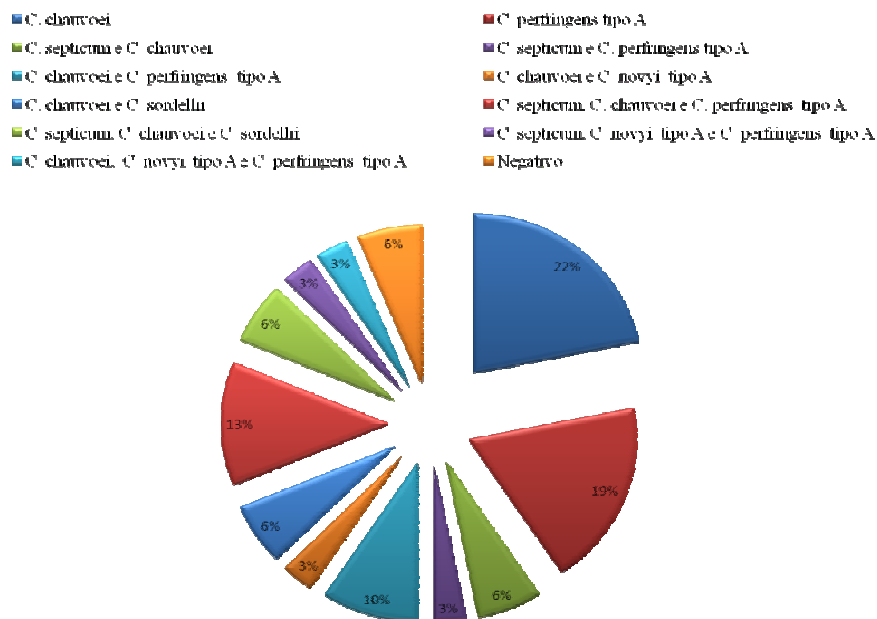


Figura 12. Diagnóstico etiológico pela imuno-histoquímica dos materiais coletados de bovinos que morreram com suspeita clínica de mionecrose entre os anos de 2000-2010 no Mato Grosso do Sul.

O padrão de distribuição dos bastonetes e as alterações histológicas foram semelhantes aos observados nos grupos de cobaias experimentalmente infectados (item 4.6). Os ruminantes naturalmente infectados por *C. septicum* apresentaram como lesão muscular predominante necrose hialina de fibras musculares e os inoculados com *C. perfringens* tipo A necrose hialina e flocular. Por sua vez, os materiais diagnosticados como positivos para *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A e *C. sordellii* apresentaram predominantemente padrão histológico compatível com necrose flocular. As

alterações relativas ao dano muscular e produção de gás não foram tão marcadamente diferenciadas como nos grupos experimentalmente inoculados, mas estavam diretamente relacionadas a quantidade de bactérias presentes no tecido, sendo as alterações mais intensas quando o agente estava mais ampla e difusamente distribuído. A infiltração de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, nos tecidos foi bem menor nos espécimes positivos para *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A (Tabela 11).

Tabela 11. Diagnóstico imuno-histoquímico associado a intensidade das lesões encontradas nos tecidos de ruminantes naturalmente infectados com clostrídios histotóxicos.

Diagnóstico pela IHQ	Lesões histológicas				
	Necrose hialina	Necrose flocular	Infiltrado inflamatório	Edema/Hemorragia	Bolhas de gás
<i>C. chauvoei</i>	Discreto	Acentuado	Discreto	Moderado	Acentuado
<i>C. perfringens</i> tipo A	Moderado	Moderado	Discreto	Moderado	Moderado
<i>C. septicum</i> e <i>C. chauvoei</i>	Acentuado	Acentuado	Moderado	Moderado	Moderado
<i>C. septicum</i> e <i>C. perfringens</i> tipo A	Acentuado	Moderado	Discreto	Acentuado	Acentuado
<i>C. chauvoei</i> e <i>C. perfringens</i> tipo A	Moderado	Acentuado	Discreto	Acentuado	Acentuado
<i>C. chauvoei</i> e <i>C. novyi</i> tipo A	Discreto	Acentuado	Moderado	Acentuado	Acentuado
<i>C. chauvoei</i> e <i>C. sordellii</i>	Discreto	Acentuado	Discreto	Acentuado	Acentuado
<i>C. septicum</i> , <i>C. chauvoei</i> e <i>C. perfringens</i> tipo A	Acentuado	Moderado	Discreto	Moderado	Moderado
<i>C. septicum</i> , <i>C. chauvoei</i> e <i>C. sordellii</i>	Moderado	Acentuado	Moderado	Acentuado	Acentuado
<i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> tipo A e <i>C. perfringens</i> tipo A	Acentuado	Moderado	Discreto	Acentuado	Acentuado
<i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> tipo A e <i>C. perfringens</i> tipo A	Moderado	Acentuado	Discreto	Acentuado	Acentuado
Negativo	Moderado	Acentuado	Moderado	Acentuado	Acentuado

Quanto a avaliação histológica do estado de conservação das amostras teciduais do estudo retrospectivo, 69% (n= 22) não apresentaram alterações autolíticas e tinham lesões compatíveis com mionecrose clostridial. Alterações autolíticas leves e moderadas foram encontradas em 25% (n=8) e 6% (n=2) casos, respectivamente. Dentre os tecidos considerados com lesões autolíticas, um foi negativo, três foram positivos apenas para *C. perfringens* tipo A, um para *C. chauvoei*, um para *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A e quatro para associação entre três clostrídios.

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico definitivo das mionecroses necessita da avaliação patológica e de exames complementares que visam o estabelecimento do agente etiológico. Essa abordagem permitirá que informações referentes à epidemiologia e ao agente específico sejam determinadas, favorecendo medidas preventivas futuras, principalmente relacionadas ao esquema de imunização. A doença é de evolução aguda e na maioria dos casos o animal morre possibilitando que o diagnóstico seja realizado somente após a morte. Nesse estudo foi possível estabelecer a imuno-histoquímica como um exame complementar viável para o diagnóstico etiológico em tecidos fixados e embebidos em parafina.

Para tanto, a utilização de cepas liofilizadas reconstituídas foi um método eficaz para a reprodução experimental da doença e para a produção de anticorpos primários, não sendo observadas reações cruzadas entre os anticorpos avaliados, quando os mesmos foram testados na aglutinação ou IHQ. Os títulos de anticorpos aglutinantes contra *C. septicum* (1:100.000) e *C. chauvoei* (1:10.000) obtidos nesse trabalho foram superiores quando comparados com o protocolo proposto por Pinto e Abreu (1992). Apesar desses pesquisadores terem preconizado o mesmo número de inoculações (n=5), o intervalos entre elas eram menores (sete dias), sendo as quatro primeira inoculações com adjuvante completo de Freund e a última com o incompleto. Os títulos demonstrados no presente estudo também foram superiores aos obtidos por Assis (2001), que propôs um protocolo em que os animais foram submetidos a seis inoculações, com intervalo de sete dias, sendo as duas primeiras feitas com emulsões de bacterinas e adjuvante completo de Freund e as demais com incompleto.

O esquema de imunização mais longo permitiu a maturação da imunidade dos animais frente aos diferentes antígenos (figura 6), sem haver interferência do menor número de inoculações com emulsões feitas com adjuvante completo. De acordo com a literatura, após a primeira inoculação de proteínas exógenas em animais que nunca tenham tido contado com ela, nenhum anticorpo será detectado por diversos dias. O período de latência persiste por até uma semana, e no final os anticorpos surgem no soro e os níveis de imunoglobulinas séricas se elevam até atingirem um pico, diminuindo ou, até mesmo, desaparecendo em poucos dias. Portanto, a resposta primária é capaz de formar uma quantidade de anticorpos relativamente pequena. A resposta humoral após uma segunda inoculação tem período de latência de dois a três dias com títulos de anticorpos aumentando rapidamente e caindo lentamente. A resposta secundária é, portanto, mais efetiva e duradoura. Inoculações subseqüentes são caracterizadas por um período de latência ainda mais curto, uma resposta humoral

maior e mais prolongada. Além disso, o maior intervalo entre as inoculações promove a maturação e diferenciação da linhagem de linfócitos B estimulados (Tizard, 2009).

Embora as condições de estocagem das cepas, a quantidade de bactérias inativadas inoculadas e o protocolo de inoculação de bacterinas tenham sido os mesmos para todos os antígenos, o número de inoculações necessárias para uma produção satisfatória de anticorpos variou entre os antígenos. Como foi demonstrado na figura 6, na imunização contra *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A, após a segunda inoculação (dia 28), os títulos se mantiveram constantes (1: 100.000) até o final, não sofrendo influência das inoculações posteriores. O mesmo ocorreu, após a quinta inoculação, para *C. chauvoei* e *C. sordellii* (1: 10.000). Os dados relativos a resposta imune dos animais, frente as diferentes antígenos, permitem inferir que os protocolos de produção de soro hiperimune podem determinar o número de inoculações a serem realizadas baseando-se no título de anticorpos obtidos por aglutinação. No entanto, mesmo que os títulos sejam elevados, acredita-se que o número de inoculações não deve ser demasiadamente pequeno, pois anticorpos produzidos depois de seguidas inoculações têm uma melhor capacidade de se ligar e neutralizar antígenos, devido à maturação da imunidade que os torna mais específicos (Tizard, 2009).

Apesar do soro hiperimune total já ter sido utilizado, com sucesso, para diagnóstico de mionecroses por Conesa et al (1995) e Vanelli e Uzal (1996), não foi avaliado a estabilidade dos soros mediante estocagem nem mesmo a interferência das demais proteínas nele presentes no teste de IHQ. A purificação de IgG's, além de garantir a estabilidade das proteínas assim obtidas, reduz a possibilidade de outras moléculas interferirem na qualidade do teste diagnóstico dada a utilização de substâncias salinas tamponadas com pH próximos ao neutro (Cassulis et al., 1991). As taxas elevadas de recuperação de IgG's utilizando-se a cromatografia por afinidade

variam de 70 a 100% (Cassulis et al., 1991) são bastante atrativas e, quando associadas as demais vantagens, justificam a adoção dessa metodologia. O protocolo de purificação utilizado levou a obtenção de concentrações protéicas de IgG's que variaram de 16,9 a 6,4 mg/mL (tabela 6), sem resíduos detectáveis de proteínas séricas contaminantes. Esses resultados são inferiores as concentrações totais obtidas por Pinto e Abreu (1992) e Assis (2001). Pinto e Abreu (1992) produziram soros contra *C. septicum* e *C. chauvoei* e recuperaram 22 e 20 mg de proteína/mL, respectivamente. Por sua vez, Assis (2001) obteve para esses mesmos dois agentes 98 e 29,7 mg de proteína/mL, respectivamente. Apesar de inferiores, ressalta-se que os autores mencionados relatam esses títulos após precipitarem todo o soro hiperimune obtido que, em geral, compreende um volume superior a 100 mL. O presente trabalho purificou apenas 1 mL de um total de 150 mL de soro hiperimune. Outro fator que deve ser considerado, é que a precipitação proporciona uma concentração de proteínas e, portanto, um menor rendimento de soro purificado, por reduzir o volume cerca de dez vezes em relação ao soro total obtido na sangria. A concentração de proteínas não é necessária quando a cromatografia de afinidade é realizada, sendo o volume de IgG's purificadas obtidas o dobro do volume de soro hiperimune purificado. Portanto, o protocolo apresentado neste experimento foi bastante eficiente na purificação de imunoglobulinas.

Ao final do protocolo de inoculação, *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A apresentaram maior título (1:100.000), *C. chauvoei* e *C. novyi* tipo A títulos intermediários (1:10.000) e *C. sordellii* o menor título (1:1.000). Esperava-se que as IgG's dirigidas contra *C. perfringens* tipo A (1:200) apresentasse, na IHQ, títulos semelhantes aos observados contra *C. septicum* (1:3.000). No entanto, a quantidade de anticorpos necessários para uma boa imunomarcagem dessa bactéria foi igual ao obtido para *C. chauvoei* (1: 200) e inferior ao de *C. sordellii* (1:400), que apresentaram títulos inferiores na aglutinação. Além do elevado título de

anticorpos aglutinantes, a quantidade de imunoglobulinas necessária por lâmina, para a IHQ, demonstra o alto potencial imunogênico da cepa de *C. septicum*, achado que corrobora com os encontrados por Pinto e Abreu (1992) e Assis (2001). Embora ainda não tenha sido demonstrada a existência de fatores constitucionais que proporcionem uma resposta dessa magnitude, sabe-se que este agente é o maior, mede de 2-10 μ m de comprimento e 0,4-1 μ m largura, sendo o maior dentre os clostrídios histotóxicos (Baldassi, 2005), possivelmente apresentando um maior número de epítomos.

As concentrações de anticorpos contra *C. septicum* utilizadas na IHQ (1:3.000) são inferiores as padronizadas por Assis et al (2005) -1:4.000- e superiores aos encontrados por Vanelli e Uzal (1996) – 1:1.000. Com relação ao anti-*C. chauvoei* a diluição padronizada (1:200) foi inferior ao determinado tanto por Assis et al (2005) como por Conesa (1995) de 1:2.000 e 1:400, respectivamente. Apesar de inferiores, as diluições apresentadas foram feitas após purificação de apenas 1 mL de soro hiperimune, ao contrário dos outros pesquisadores que relatam títulos a partir de soro hiperimune total ou purificado e concentrado.

Os achados de necropsia encontrados nos cobaios do grupo controle, como discreto aumento de volume muscular, bem como a discreta hemorragia, edema e necrose do membro inoculado (tabela 8), eram esperados e corroboram com os demonstrados por Baldwin e Gilmour (1927). As alterações observadas no ponto de inoculação muscular se devem ao excesso de cálcio na musculatura esquelética que promove uma alteração da osmolaridade do tecido, promovendo um maciço influxo desse mineral para o interior das fibras musculares. Assim também, esperava-se encontrar a discreta degeneração, necrose, hemorragia e infiltrado neutrofílico observados na histopatologia (tabela 9). Acredita-se que o mecanismo que causou necrose das fibras musculares é semelhante ao observado no Paradoxo do Cálcio. Já foi demonstrado que

esse excesso de cálcio pode levar a perda de contratilidade em fibras musculares cardíacas, resultando em uma extensa lesão devido a uma indução de necrose e apoptose celular (Xu et al., 2006), gerando condições para que bactérias anaeróbicas, como é o caso dos clostrídios passem para a forma vegetativa e se multipliquem causando doença. Por isso, a inoculação das cepas toxigênicas de clostrídios histotóxicos juntamente com CaCl_2 é uma estratégia antiga e que raramente falha na reprodução da doença (Baldwin e Gilmour, 1927).

Os resultados relativos ao curso clínico da doença e morte, apresentados na tabela 7, podem ser atribuídos à centrifugação e padronização do inóculo bacteriano pela escala Mac Farland, evitando-se variações quanto aos componentes tóxicos, presentes na cultura e no número de células bacterianas inoculadas. Assis et al (2005) fizeram um experimento no qual os cobaios eram inoculados com cepas de igual origem das utilizadas nesse trabalho (exceto de *C. perfringens* tipo A que não foi inoculado) e sacrificados com o aparecimento dos sinais clínicos, que ocorreram entre 24 e 36 horas após inoculação (Assis et al., 2005). Nos trabalhos de Conesa (1995) e Vanelli e Uzal (1996), o tempo para aparecimento de sinais e sacrifício dos animais foi de 18 horas. Diferentemente da metodologia empregada no presente trabalho, os demais pesquisadores inocularam quantidades variáveis de bactérias visto que a suspensão bacteriana era obtida diretamente a partir da cultura, não havendo uma padronização do inóculo. Comparativamente, a metodologia de inoculação de bactérias, adotada no presente trabalho, reduziu tempo do curso clínico da doença, visto que os primeiros sinais clínicos foram observados duas horas após a inoculação e a morte do primeiro animal, nos cinco grupos infectados, ocorreu entre 8 e 31 horas, tempo semelhante ao aparecimento dos sinais clínicos considerado por todos os trabalhos citados. Apesar de o inóculo ter sido padronizado quanto à quantidade de células bacterianas, o curso clínico variou bastante entre os diversos grupos experimentais, fato que

pode ser atribuído as diferenças quanto à patogenicidade das estirpes utilizadas.

O período entre o aparecimento dos primeiros sinais clínicos e morte em infecções naturais tem o curso variando de 12 horas a semanas dependendo da espécie em que a doença é relatada, da espécie de clostrídio envolvida e do tratamento instituído (Oaks et al., 1997; Assis et al., 2002; Choi et al., 2003; Brett et al., 2005; Lima et al., 2006; Dylewski et al.; 2007; Rahman et al., 2009; Tellez et al., 2009). Acredita-se que além dessas variações, a quantidade de bactéria inoculada e/ou presente bem como a extensão da lesão sejam fatores que também interferiram no curso da doença. Por isso, é difícil estabelecer uma correlação entre o tempo de infecção até a morte com as espécies de clostrídios envolvidas tanto nos animais experimentalmente infectados quanto nos que desenvolvem a doença naturalmente.

Os cobaios dos grupos experimentais apresentaram na necropsia alteração da coloração, volume e consistência da área de inoculação, sendo possível observar edema e necrose muscular. Essas lesões são compatíveis com os quadros de mionecroses que acometem naturalmente animais domésticos (Peek et al., 2003; Lima et al., 2006) e humanos (Smith-Slatas et al., 2009, McGuigan et al., 2002). No entanto, assim como o tempo entre inoculação e morte, a intensidade e aspectos dessas lesões variaram entre os grupos. Na histologia, as lesões diferiram quanto a intensidade e apresentaram particularidades. Por isso, considera-se uma importante contribuição a descrição detalhada das análises macroscópicas e microscópicas.

Comparando-se o grupo controle com os experimentais (Tabela 8), observou-se que o agente químico utilizado causou poucas e discretas lesões. Dentre os animais dos grupos experimentais, os dos grupos 1 (*C. septicum*) e 5 (*C. sordellii*) foram os que apresentaram um quadro sistêmico mais generalizado, indicando a grande patogenicidade das cepas quando

comparada aos demais grupos. Os outros grupos apresentaram acometimento do membro contralateral e sistêmico discretos.

As diferenças quanto às alterações anatomo-patológicas foram discretas (Tabela 8), exigindo um elevado grau de acurácia na descrição. Talvez por isso, a maioria dos achados de necropsia descrita nos relatos de casos e nos encaminhados juntamente com amostras dos casos naturais das doenças é rotineiramente insuficiente para o direcionamento do diagnóstico etiológico específico. No entanto, a detalhada descrição das lesões auxilia no diagnóstico presuntivo e descarta uma série de outras patologias que causam morte súbita do animal associada a edema subcutâneo e necrose muscular. Por exemplo, a picada de cobra da espécie *Bothrops spp*, uma espécie de ofídio comuns no Brasil e popularmente conhecidas como jararacas, causa necrose muscular associado a severo dano vascular com hemorragia e edema geralmente acentuados, no entanto, em carcaças examinadas imediatamente após a morte, não se observa crepitação da musculatura nem outras alterações relacionadas a presença de gás (Dourado et al., 2007). Da mesma forma, as miosites causadas por bactérias aeróbias como: *Staphylococcus aureus* (Costa et al., 2004; Azevedo et al. 2004; Gonçalves e Fernandes, 2005), *Aeromonas* e *E. coli* (Crum-Cianflone, 2008) podem, nos estágios avançados da doença, levar também a grande acúmulo de exsudato purulento. No entanto, nos estágios iniciais os animais apresentam dor, febre e seus músculos têm consistência alterada e podem apresentar-se necróticos, sinais muito semelhante a mionecroses causadas por clostrídios (Crum-Cianflone, 2008).

Como as infecções são frequentemente associadas, as alterações anatomopatológicas podem ser diferentes das aqui descritas. No entanto, a diferenciação entre as alterações relativas a coloração do músculo nas miosites causada por *C. septicum* e *C. chauvoei* são amplamente difundidas e corroboram com as descritas neste trabalho (Hatheway,

1990). Descrições semelhantes foram feitas para animais naturalmente infectados com *C. perfringens*. Rhaman et al (2009) relataram um caso de um elefante (*Elephas maximus*) que morreu após apresentar sinais clínicos compatíveis com mionecrose. Na necropsia foi possível observar que a musculatura acometida encontrava-se hemorrágica com coloração vermelho-azulada. O diagnóstico etiológico de *C. perfringens* foi feito por PCR. As celulites gangrenosas observadas em aves, que geralmente tem como agente etiológico *C. septicum* e *C. perfringens* tornam as musculatura acometidas vermelha intensa e/ou esverdeadas (Clark et al., 2010).

A formação de bolhas associadas à epiderme, encontrada na necropsia dos animais dos grupos 3 (*C. novyi* tipo A) e 4 (*C. perfringens* tipo A) (tabela 8), não é uma descrição de necropsia frequentemente associada com a gangrena gasosa em animais. Possivelmente esse fato esteja relacionado às espécies em que essa doença é descrita. Bovinos, caprinos, ovinos, eqüinos e suínos possuem uma larga e extensa camada de derme e epiderme altamente queratinizada o que provavelmente poderia dificultar a visualização ou exteriorização destas bolhas. Em humanos, no entanto, essa alteração é mais comum e além das espécies apresentadas neste trabalho, acontece nas infecções causadas *C. septicum* (Abella et al., 2003).

Assim como nas observações macroscópicas, ao comparar-se a histopatologia do grupo controle com os experimentais, observou-se que o agente químico utilizado, causou poucas e discretas alterações no padrão histológico dos tecidos coletados. Dentre os animais dos grupos experimentais, os dos grupos 1 (*C. septicum*) foram os que apresentaram alterações mais intensas e os grupos 2 (*C. chauvoei*), 3 (*C. novyi* tipo A) e 4 (*C. perfringens* tipo A) tiveram lesões histológicas moderadas. Apesar das lesões macroscópicas observadas no grupo 5 (*C. sordellii*) terem sido consideradas generalizadas, as histológicas foram

classificadas como discretas a moderadas (Tabela 9).

As alterações ligadas a degeneração hialina e necrose flocular das fibras musculares, nesse modelo experimental, estão relacionadas a capacidade das cepas de produzirem toxinas, colonizarem os tecidos e a potência das toxinas produzidas por cada espécie de clostrídio histotóxico (Van Vleet & Valentine, 1993; Baldassi, 2005). As lesões musculares, alterações relacionadas a hemodinâmica tecidual, comportamento das células de defesa e distribuição de bacilos podem contribuir não só para o diagnóstico etiológico como também para o entendimento da ação de toxinas e patogênese de cada agente.

Apesar da degeneração hialina das fibras musculares ter sido observada em todos os grupos, essas eram mais extensas e multifocalmente distribuídas nos tecidos musculares de todos os animais do grupo 1 (*C. septicum*). Neste grupo, a tumefação celular caracterizada por aumento de volume e arredondamento da fibra sem a formação de vacúolos foi um achado predominante. Provavelmente, isso pode ser atribuído ao mecanismo de ação da toxina alfa de *C. septicum* que determina a formação de poros na membrana celular, levando ao aumento do influxo de fluidos e acúmulo intracelular de líquidos nas fibras musculares com conseqüente aumento de volume e arredondamento celular (Hang'ombe et al., 2004). Por causar lesões nas membranas celulares, a toxina alfa de *C. perfringens* tipo A também pode levar a degeneração das fibras musculares (Titball et al., 1999), mas essa alteração não foi tão predominante e intensa como as observadas no grupo 1. A principal lesão observada nas fibras musculares dos grupos 2, 3 e 5 foi a necrose flocular, sendo a necrose hialina um achado focalmente distribuído. As toxinas produzidas por *C. novyi* tipo A e *C. sordellii* causam necrose por um mecanismo distinto das toxinas produzidas pelas espécies de clostrídios inoculadas no grupo 1 e 4. As toxinas produzidas por esses agentes alteram o citoesqueleto de actina e por isso foi possível observar fibras com acidofilia do

citoplasma, picnose/cariólise nuclear ou fragmentação citoplasmática (Geny et al., 2007). Sabe-se que a LT produzida por *C. sordellii* também é capaz de induzir a morte celular por apoptose (Petit et al., 2003) um processo que, ao contrário da necrose, causa morte celular com mínima reação inflamatória. A discreta reação inflamatória foi um achado bastante marcante observado nos animais experimentalmente inoculados com *C. sordellii*, que nos levam a acreditar que possivelmente algumas fibras possam ter entrado em apoptose. A ausência de componentes inflamatórios também foi observada em camundongos inoculados com LT intraperitoneal (Geny et al., 2007). No entanto, mais estudos teriam que ser realizados para a confirmação dessas hipóteses.

A necrose do endotélio das vênulas, só não observada no grupo 3, é compatível com a descrição sobre a ação das toxinas. A toxina alfa de *C. perfringens*, por exemplo, tem um efeito citotóxico primário no endotélio vascular levando a perda de líquido do sistema circulatório e acúmulo de infiltrado inflamatório ao redor das mesmas (Tveten et al., 2001). Da mesma maneira, acredita-se que a toxina alfa de *C. septicum* atue diretamente sobre as células do endotélio vascular, determinando necrose, visto que as células endoteliais possuem inúmeros receptores GPI, necessários para a ligação dessa proteína (Sendo e Araki, 1999). O endotélio das vênulas também é sensível a ação da LT de *C. sordellii*, mas o mecanismo de atuação envolve a alteração das junções celulares devido a inibição de duas GTPases (Rho e Rac) que retiram a habilidade das caderinas de promoverem a junção celular. Apesar dessa alteração não ter sido observada nos animais inoculados com *C. novyi* tipo A, a toxina alfa produzida por esta bactéria pode potencialmente causar dano sobre o endotélio vascular, visto que a mesma atua sobre a GTPase Rho e Rac simultaneamente (Gerhard et al., 2004; Philippova et al., 2005).

Embora as alterações cardíacas tenham sido encontradas apenas no miocárdio de animais dos grupos 1, 3 e 4, acredita-se que todos os clostrídios histotóxicos sejam

potencialmente capazes de causar miocardite e pericardite (Geny et al., 2007). Nos demais órgãos, não foram observadas alterações. A lipidose hepática é normalmente observada quando há um desequilíbrio entre síntese, utilização e metabolização de lipídios que pode ter sido determinada pela atuação sistêmica das toxinas ou por deficiências nutricionais (Baldassi, 2005).

Em geral, as descrições a respeito das lesões macroscópicas observadas em animais acometidos por mionecroses restringem-se a observação do aumento de volume, crepitação, edema subcutâneo e alteração da coloração da musculatura do membro acometido. As lesões microscópicas são definidas como uma miosite neutrofílica e necrosante aguda. No entanto, os resultados apresentados demonstram que um diagnóstico presuntivo baseado em acurada observação dos sinais clínicos, dados de necropsia e histologia juntamente com o diagnóstico etiológico laboratorial são indispensáveis. Todas essas informações associadas permitem o questionamento quanto a presença ou não de bactérias que podem ser contaminantes e ter se instalado na carcaça *post mortem*. Sendo assim, é importante ressaltar que a associação do quadro clínico com as lesões características fornece maior confiabilidade no diagnóstico final das mionecroses. Ou seja, a demonstração das lesões características associadas à presença da bactéria intralesional, como demonstrado no presente trabalho, indica que a doença ocorreu, não podendo ser considerada apenas como uma proliferação *post mortem*.

A ausência de imunomarcagem nas secções de tecidos do músculo do ponto de inoculação utilizando anticorpos contra as outras espécies de clostrídios confirma a especificidade dos anticorpos primários nas diluições empregadas na técnica LSAB, demonstrando mais uma vez que a técnica utilizada na preparação dos soros hiperimunes foi adequada. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a técnica LSAB mostrou-se específica e sensível para identificação dos clostrídios histotóxicos.

A acentuada quantidade de bastonetes nas secções de músculos dos animais inoculados com *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A provavelmente ocorreu como consequência da ação da toxina alfa, que são as mais potentes dentre as toxinas produzidas pelos clostrídios histotóxicos (Hatheway, 1990). A ação da toxina contribui para a progressão do dano muscular e vascular, tornando o ambiente mais propício para a multiplicação desses anaeróbios (Baldassi, 2005).

Embora o material de eleição para diagnóstico etiológico das mionecroses seja a musculatura afetada, esses microrganismos podem ser encontrados em outros órgãos como baço, fígado, rim, medula de ossos longos e coração não sendo este um fator de impedimento (Assis et al., 2005). Dentre as lâminas com tecido cardíaco de bovinos que adoeceram naturalmente, *C. chauvoei* foi o único agente marcado positivamente. A identificação de clostrídios histotóxicos em outros órgãos como coração, fígado e baço já foi relatada em um estudo com cobaias experimentalmente inoculados (Assis et al., 2005) e em um estudo retrospectivo (Assis et al., 2010). O carbúnculo sintomático visceral, um achado tido como bastante incomum, também foi demonstrado por outros pesquisadores (Uzal et al., 2003, Assis et al., 2010) e, assim como nesse trabalho, foi encontrado em animais jovens com idade inferior a 24 meses.

C. chauvoei e *C. perfringens* tipo A foram os únicos dois agentes encontrados isoladamente no estudo retrospectivo. Os achados apontaram *C. chauvoei* como o agente mais prevalente, corroborando com os encontrados por outros pesquisadores (Willians, 1977; Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985, Assis et al., 2010). No entanto, nenhum dos trabalhos anteriores contemplaram o estudo de frequência de *C. perfringens* tipo A, o segundo agente mais prevalente deste estudo. Com exceção do estudo realizado por Willians (1977) que firmou *C. novyi* como segundo agente mais prevalente, os demais estudos detectaram *C. septicum* (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985; Assis et al., 2010). Ao contrário

dos demais trabalhos nenhum dos materiais examinados por este estudo apresentou *C. septicum* (Willians, 1977, Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985 e Assis, 2010), *C. novyi* (Williamns, 1977) ou *C. sordellii* (Willians, 1977) como único agente causador de gangrena gasosa. A ocorrência desses agentes esteve relacionada a associação de um ou mais clostrídios histotóxicos. *C. septicum* em associação com *C. chauvoei* ou com *C. novyi* foram também descritos por Assis (2010) e Lima (2006), respectivamente. Assim também, *C. chauvoei* foi achado em associação com *C. novyi* tipo A (Williams, 1977; Morris et al., 2002; Assis, 2010). Embora o presente trabalho tenha achado um número de associações entre clostrídios superior e diferente das previamente descritas, sabe-se que grande parte dos clostrídios podem colonizar sinergicamente ambientes nutritivos e considera-se mais importante a alta frequência da maioria deles do que a associação em si. O maior número de associações também pode ter refletido a inclusão de um novo agente a ser detectado.

Além disso, elevada proporção de associação entre clostrídios, representando 60% dos casos encontrados, deve ser cuidadosamente avaliada, pois 41% desses apresentavam alterações histológicas autolíticas leves a moderadas. Como a maioria dos clostrídios histotóxicos estão amplamente difundidos no ambiente e são saprófitos do trato gastrointestinal dos animais, essas bactérias podem invadir a carcaça, resultando em altas proporções de positivos (Hatheway, 1990). Embora esses microrganismos sejam considerados frequentes invasores de carcaças, considera-se que nas amostras em bom estado de preservação, os agentes encontrados sejam os causadores da doença (Uzal et al., 2008). Sendo assim, a presença de alterações compatíveis com mionecrose associadas a detecção do agente *in situ* indicam que a doença ocorreu e permitem o diagnóstico definitivo. No presente estudo retrospectivo, as amostras em que *C. perfringens* tipo A foi detectado isoladamente mostraram leves alterações histológicas autolíticas. No entanto, as

lesões histológicas típicas de mionecrose associadas aos numerosos bacilos dessa bactéria detectada pela IHC, possibilitaram o diagnóstico final.

Quase 85% das amostras desse estudo eram oriundas de bovinos que tinham idade igual ou inferior a 14 meses e mais de 92% tinham idade igual ou inferior a 24 meses, fato bastante comum a animais acometidos pelas bactérias histotóxicas do gênero *Clostridium*. O animal com idade superior a 24 meses foi positivo para *C. perfringens* tipo A. Dos dois resultados negativos, um era oriundo de um animal com 24 meses e o outro com idade não informada. Em geral, animais jovens, com elevado patamar nutricional, são considerados os mais susceptíveis ao carbúnculo sintomático (Sterne, 1981), não sendo descritas relações com idade e gangrena gasosa. Além disso, as amostras foram oriundas, em sua maioria (mais de 71% dos casos), de animais que morreram ou foram sacrificados com sinais clínicos compatíveis. Por isso, o diagnóstico positivo para pelo menos um dos clostrídios histotóxicos em 93,8% das amostras avaliadas era esperado. Apesar de mais de 73% das amostras serem positivas para *C. chauvoei* não ser um dado surpreendente, os 54% de amostras positivas para *C. perfringens* tipo A, mostrou-se como um dado bastante interessante. Embora seja um agente comumente incriminado como causador de gangrena gasosa em humanos, parece ser a primeira vez que o mesmo é descrito em bovinos e ovinos tanto isoladamente quanto em associação como agente etiológico da gangrena gasosa. Dentre os animais que tiveram esse agente causando doença isoladamente, não foram descritos sinais clínicos ou de necropsia diferentes dos normalmente feitos para animais acometidos por gangrena gasosa, a exceção da grande frequência de relatos de morte súbita dentre esses animais.

No entanto, a literatura acerca do diagnóstico dessa doença trata os achados histológicos de maneira geral como necrose e degeneração de fibras musculares, com hemorragia e infiltrado inflamatório associado a presença extensa de bolhas de

gás e colônias bacterianas, ficando difícil estabelecer comparações. Sobre o diagnóstico de mionecroses causadas por bactérias do gênero *Clostridium* é sempre muito importante que se faça considerações a respeito do estado de conservação do material. Como a maioria dos clostrídios está amplamente difundidos no ambiente e são saprófitos do trato gastrointestinal dos animais, a coleta de tecidos de animais mortos a mais de 12 horas, ou até mesmo com autólise instalada, pode resultar em falsos positivos devido a contaminação das carcaças (Hatheway, 1990). Diante de métodos como a IFD, a análise do estado de conservação do material recebido tende a ser limitado a uma avaliação macroscópica. A histologia associada a IHQ, ao contrário, permite a avaliação histológica da lesão e do grau de autólise, sendo possível determinar parâmetros que permitam uma maior segurança na atribuição do diagnóstico.

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são produzidas cerca de 150 milhões de doses de vacinas contra clostridioses por ano. Apesar da significativa produção de vacinas clostridiais, não existe um controle oficial que ateste a qualidade quanto à potência de todos os componentes destes produtos. O MAPA avalia sistematicamente as bacterinas de *C. chauvoei*, toxóides botulínicos tipo C e D e, desde 2009, os toxóides beta e épsilon de *C. perfringens* tipo B, C e D. No Brasil, a qualidade dos demais componentes é deixado, portanto, a cargo das indústrias produtoras. Não bastasse os freqüentes lotes com qualidade aquém do recomendado pela legislação brasileira, o que se pode observar com esse estudo é que *C. perfringens* tipo A, um dos mais prevalentes agentes causadores de gangrena gasosa, não compõem nenhuma das vacinas comercializadas. Infelizmente, um pequeno e restrito número de casos estavam disponíveis para realização deste estudo e para se determinar a real freqüência dos clostrídios responsáveis por causarem mionecroses, mais materiais seriam necessários.

O diagnóstico da gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático é usualmente baseado em sinais clínicos e achados de necropsia e o definitivo é, normalmente, obtido pelo cultivo e isolamento dos agentes envolvidos. Entretanto, os clostrídios envolvidos nessas doenças são nutricionalmente exigentes e o cultivo deles consome muito tempo, além de necessitar de pessoal treinado e da aquisição de meios de cultura relativamente onerosos (Assis et al., 2005). Alternativamente, a IHQ é um método diagnóstico que pode ser empregado sem a necessidade de material fresco ou especialmente condicionado, com conservação da morfologia tissular por longos períodos. Além disso, trata-se de um método simples, rápido, barato e capaz de identificar especificamente quaisquer dos clostrídios causadores de gangrena gasosa ou carbúnculo sintomático. Essa técnica é especialmente importante em locais onde as facilidades laboratoriais para cultivo de anaeróbios não estão prontamente disponíveis, além de permitir estudos retrospectivos.

6 CONCLUSÕES

A imuno-histoquímica utilizando o complexo streptavidina biotina marcada (LSAB) mostrou-se eficiente para detecção de *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. sordellii* e *C. perfringens* tipo A tanto em tecidos de cobaias experimentalmente infectados quanto em materiais oriundo de animais que apresentaram infecção natural, sendo recomendável a implementação dessa técnica à rotina de diagnóstico. Dentre os materiais coletados de ruminantes que morreram com suspeita clínica de mionecrose no Estado do Mato Grosso do Sul entre os anos de 2000 e 2010, foi possível detectar a presença dos cinco clostrídios histotóxicos, sendo *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A os mais freqüentes causadores dessa patologia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLA, B.S.; KUCHINIC, P.; HIRAOKA, T. *et al.* Atraumatic Clostridial myonecrosis: case report and literature review. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 24, n. 4, p. 401-5, 2003.
- ALDAPE, M.J.; BRYANT, A.E.; KATAHIRA, E.J. *et al.* Innate immune recognition of, and response to, *Clostridium sordellii*. *Anaerobe*, v. 16, n. 2, p. 125-30, 2010.
- ALDAPE, M.J.; BRYANT, A.E.; STEVENS D.L. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clinical Infectious Disease*, v. 43, n.11, p. 1436-46, 2006.
- ALEMAN, M.; WATSON, J.L.; JANG, S.S. *Clostridium novyi* type A intra-abdominal abscess in a horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 17, n.6, p. 934-6, 2003.
- AMINOMOTO, K.; OHGITANI, T.; SASAKI, O. *et al.* Protective effect of *Clostridium septicum* alpha toxoid vaccine against challenge with spores in guinea pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 1, p. 67-9, 2002.
- ARONOFF, D.M.; BALLARD, J.D. *Clostridium sordellii* toxic shocks syndrome. *Infection*, v. 9, n.12, p. 725-26, 2009.
- ASSIS, R.A. *Padronização da imunohistoquímica para detecção de Clostridium septicum e Clostridium chauvoei e comparação com a imunofluorescência direta*. 2001. 34f. Dissertação de (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; DIAS, L.D. *et al.* Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Revista de Medicina Veterinária*, v.82, n.1, p.68-70. 2001.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.L.; MARTINS, N.E. *et al.* An outbreak of malignant edema in cattle. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v. 97, n.543, p. 143-45, 2002.
- ASSIS, R.A. *Mionecrosis: estudos epidemiológicos e moleculares*. 2005. 70f. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R. *et al.* Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, n.1, p. 4-8, 2005.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; NASCIMENTO, R.A.P. *et al.* Mionecroses clostridiais bovinas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.2, p.331-334, 2010
- AZEVEDO, P.S.; MATSUI, M.; MTSUBARA, L.S. *et al.* Piomiosite tropical: apresentações atípicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 3, p. 273-8, 2004.
- BAGGE, E.; STERNBERG, S.; JOHANSSON, K.E. Detection and identification by PCR of *Clostridium chauvoei* in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 51, n. 8, 1751-1760, 2009.
- BALDASSI, L. Clostridial toxins- potent poisons, potent medicines. *Journal of Venom Animal Toxins Incl Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p 392-411, 2005.
- BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E.M.B. *et al.* Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos – 1970-1979, no Estado de São Paulo.
- BALDWIN, J.H.; GILMOUR, W.R. A study of gás gangrene in civil surgery. *Annals of surgery*, v. 85, n.2, 1927.

- BALL, D.W.; VAN TASSELL, R.L.; ROBERTS, M.D. *et al.* Purification and characterization of alpha toxin produced by *Clostridium novyi* type A. *Infection and Immunity*, v.61, n.7, p. 2912-18, 1993.
- BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D. *et al.* Purification and characterization of the lethal toxin (alpha toxin) of *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity*, v. 60, n.3, p. 784-90, 1992.
- BALLARD, J.; SOKOLOV, Y.; YUAN, W.L. *et al.* Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Molecular Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 627-34, 1993.
- BARROS, C.S.L. Sistema Muscular In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. *Patologia Veterinária*. São Paulo, Roca, 2010. p.697-746.
- BERNHEIMER, A.W. Parallelism in the lethal and hemolytic activity of toxin of *C. septicum*. *Journal Experts Medicine*, v. 80, n.4, p. 309-20, 1944.
- BERTHEAU, P.; CAZALS-HATEM, D.; MEIGNIN, V. *et al.* Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *Journal of Clinical Pathology*, v. 51, n. 5, p. 370-4, 1998.
- BRETT, M.M.; HOOD, J.; BRAZIER, J.S. *et al.* Soft tissue infections caused by spore-forming bacteria in injection drug users in United Kingdom. *Epidemiologic Infection*, v. 133, n.4, p. 575-82, 2005.
- BUSCH, C.; SCHOMIG, K.; HOFMANN, F. *et al.* Characterization of the catalytic domain of *Clostridium novyi* alpha toxin. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 11, p. 6378-83, 2000.
- CARLONI, G.H.; BENTANCOR, L.D.; DE TORRES, R.A. Deoxyribonuclease activity detection in *Clostridium chauvoei* strains. *Revista Argentina de Microbiologia*. v.37, n. 2, p. 87-8, 2005.
- CASSULIS, P.; MAGASIC, M.V.; DEBARI, V.A. Ligand affinity chromatographic separation of serum IgG on recombinant proteinG-silica. *Clinical Chemistry*, v. 37, n.6, p. 882-6, 1991.
- CLARK, S.; PORTER, R.; McCOMB, B. *et al.* Clostridial dermatitis and cellulitis: an emerging disease of turkeys. *Avian Diseases*, v. 54, n.2, p. 788-94, 2010.
- CHOI, Y.K.; KANG, M.S.; YOO, H.S. *et al.* *Clostridium perfringens* type A myonecrosis in a horse in Korea. *Journal Veterinary Medical Science*, v. 65, n.11, p. 1245-47, 2003.
- CONESA, L.C.G.; VANNELI, A.S.; UZAL, F.A. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. *Veterinary Research Communications*, v. 19, n.6, p. 451-6, 1995.
- CORREA, W.M.; CORREA, C.N.N.; LOPES, C.A.M. *et al.* Enfermidades por clostrídios 1969-78. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 32, p. 369-74, 1980.
- COSTA, I.M.C., PONTES, S.S.; CABRAL, A.L.S.V. *et al.* Fasciíte necrosante: revisão com enfoque nos aspectos dermatológicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 7, n. 2, p.211-24, 2004.
- CRUM-CIANFLONE, N.F. Bacterial, fungal, Parasitic and viral myositis. *Clinical Microbiological Reviews*, v. 21, n.3, p. 473-494, 2008.
- CUNNIFFE, J.G. *Clostridium sordellii* bacteraemia. *Journal of Infection*, v. 33, n.2, p. 127-29, 1996.
- DANG, L.H.; BETTEGOWDA, C.; HUSO, D.L. *et al.* Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy Science U S A*, v. 98, n. 26, p. 15155-60, 2001.

- DIAZ, L.A.J.R.; CHEONG, I.; FOSS, C.A. *et al.* Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores. *Toxicological Sciences*, v.88, n. 2, p. 562–575, 2005.
- DORNBUSCH, K.; NORD, C.E.; DAHLBÄCK, A. ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *CLOSTRIDIUM* SPECIES ISOLATED FROM HUMAN INFECTIONS. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES*, v. 7, N. 2, P. 127-34, 1975.
- DOURADO, D.M.; MATIAS, R.; ALMEIDA, M.F. *et al.* The effects of low-level laser on muscle damage caused by *Bothrops neuwiedi* venom. *Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases*, v. 14, n.3, p. 423-34, 2008.
- DYLEWSKI, J.; DRUMMOND, R.; ROWEN, J. A case of *Clostridium septicum* spontaneous gas gangrene. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, v. 9, n. 2, p. 133-5, 2007.
- FRIENDSHIP, C.R.; BILKEI, G. Concurrent swine erysipelas and *Clostridium novyi* infections associated with sow mortality in outdoor sows in Kenya. *Veterinary Journal*, v. 173, n. 3, p. 694-6, 2007.
- GABAY, E.L.; ROLFE, R.D.; FINEGOLD, S.M. Susceptibility of *Clostridium septicum* to 23 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemootherapy*, v. 20, n. 6, p. 852-3, 1981.
- GENTILE, J.; GENTILE, S.; ALLENDE, O.G. *et al.* Spontaneous hepatic gas gangrene. *Anaerobe*, v. 5, n.3, p. 395-6, 1999.
- GENY, B.; KHUN, H.; FITTING, C. *et al.* *Clostridium sordellii* lethal toxin kills mice by inducing a major increase in lung vascular permeability. *The American Journal of Pathology*, v. 170, n. 3, p. 1003-1017, 2007.
- GERHARD, R. Large clostridial cytotoxins. *Review Physiology Biochemistry Pharmacology*, v. 152, p. 23-47, 2004.
- GIMENO, E.J. Fundamentos da imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, Ilton José Nunes, 1995, p.17-51.
- GLASTONBURY, J.W.R.; SEARSON, J.E.; LINKS, I.J. Clostridial myocarditis in lambs. *Australian Veterinary Journal*, v. 65, n.7, p. 208-9, 1988.
- GONÇALVES, A.O.; FERNANDES, N.C. Piomiosite tropical. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.80, n. 4, p. 413-4, 2005.
- GORDON, V.M.; BENZ, R.; FUJII, K. *et al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infection and Immunity*, v. 65, n.10, p.4130-134, 1997.
- GORDON, V.M.; NELSON, K.L.; BUCKLEY, J.T. *et al.* *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.38, p. 27274-80, 1999.
- GREEN, G.A.; SCHUE, V.; MONTEIL, H. Cloning and characterization of the cytotoxin L-encoding gene of *Clostridium sordellii*: homology with *Clostridium difficile* cytotoxin B. *Gene*, v. 161, n.1, p. 47-61, 1995.
- GUARNER, J.; BARLETT, J.; REAGAN, S. *et al.* Immunohistochemical evidence of *Clostridium sp*, *Staphylococcus aureus*, and group A *Streptococcus* in severe soft tissue infections related to injection drug use. *Human Pathology*, v.37, n.11, p. 1482-8, 2006.
- GYLES, C.L. Histotoxic clostridia. In GYLES, CL, THEON, CO. *Clostridia*. 2.ed. Ames:Iowa State University Press, 1993, p. 106-13.
- HANG'OMBE, B.M.; ISOGAI, E.; LUNGU. *et al.* Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, v. 23, n. 4, p. 277-84, 2000.

- HANG'OMBE, M.B.; MUKAMOTO, M.; KOHDA, T. *et al.* Cytotoxicity of *Clostridium septicum* alpha-toxin: its oligomerization in detergent resistant membranes of mammalian cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 37, n. 6, p. 279-86, 2004
- HANG'OMBE, B.M.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M. *et al.* Purification and sensitivity of *Clostridium chauvoei* hemolysin to various erythrocytes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 29, n.4, p. 263-68, 2006.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 3, p. 66-98, 1990.
- HELMAN, G.; WELSH, R.D.; STAIR, E.L. *et al.* Diagnosing visceral blackleg as a cause of sudden death in cattle. *Veterinary Medicine*, v.92, n.10, p.914-18, 1997.
- HICKEY, M.J.; KWAN, R.Y.Q.; AWAD, M.M. *et al.* Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *Plos Pathogens*, v. 4, n. 4, p.1-9, 2008.
- KACHMAN, M.T., HURLEY, M.C.; THIELE, T. *et al.* Comparative analysis of extracellular proteomes of two *Clostridium sordellii* strains exhibiting contrasting virulence. *Anaerobe*, v. 16, p. 454-60, 2010.
- KIJIMA-TANAKA, M.; OGIKUBO, Y.; KOJIMA, A. *et al.* Flagella based enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation the immunity in mice vaccinated with blackleg vaccines. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 79-85, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- LIMA, C.G.R.D.; SALVARANI, F.M.; GOMES, A.M. *et al.* Surto de gangrena gasosa em rebanhos de ovinos e caprinos. *Ciência Veterinária dos Trópicos*, v. 9, n.2/3, p. 106-09, 2006.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; SALVARANI, F.M. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v. 102, p.23-34, 2007.
- LOBATO, F.C.F.; LIMA, C.D.G.R.; ASSIS, R.A. *et al.* Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D épsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v. 28, n. 38, p. 6125-7, 2010.
- LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3ed. New York: McGraw Hill, 1968
- MARTINEZ, R.D.; WILKINS, T.D. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* hemorrhagic toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin). *Infection Immunity*, v. 56, n.5, p. 1215-21, 1988.
- McGUIGAN, C.C.; PERICE, G.M.; GRUER, L. *et al.* Lethal outbreak of infection with *Clostridium novyi* type A and other spore-forming organisms in Scottish injecting drug users. *Journal of Medicine Microbiology*, v.51, n.11, p.871-77, 2002.
- MELTON-WITT, J.A.; BENTSEN, L.M.; TWETEN, R.K. Identification of functional domains of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Biochemistry*, v.45, n.48, p. 14347-354, 2006.
- MICALIZZI, B.; GUZMAN, A.M.S. Protective activity of different immunosera against *Clostridium chauvoei*. *Anaerobe*, v. 3, n. 2-3, p. 127-9, 1997.
- MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M. Malignant oedema associated with navel infection in a Merino lamb. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, p. 448-49, 2002.
- MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *The Journal of Pathology and bacteriology*, v. 77, n.2, p. 341-50, 1959.

- OAKIS, J.L.; KANALY, S.T.; FISHER, T.J. *et al.* Apparent *Clostridium haemolyticum*/*Clostridium novyi* infection and exotoxemia in two horses. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, n. 3, p. 324-5-1997.
- PEEK, S.F.; SEMRAD, S.D.; PERKINS, G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equine Veterinary Journal*, v. 35, n. 1, p. 86-92, 2003.
- PETIT, P.; BRÉARD, J.; MONTALESCOT, V. *et al.* Lethal toxin from *Clostridium sordellii* induces apoptotic cell death by disruption of mitochondrial homeostasis in HL-60 cells. *Cellular Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 761-71, 2003.
- PHILIPPOVA, M.; IVANOV, D.; ALLENSPACH, R. *et al.* RhoA and Rac mediate endothelial cell polarization and detachment induced by T-cadherin. *The FASEB Journal*, v. 19, n.6, p.588-90, 2005.
- PINTO, M.P.; ABREU, V.L.V. Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti- *Clostridium septicum* e anti- *Clostridium chauvoei*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 44, n. 6, p. 513-520, 1992.
- PINTO, F.F.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. *et al.* Edema maligno em suíno. *Ciência Rural*, v. 35, n. 1, p. 227-29, 2005.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; BRYAN, K. *et al.* *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre, Artmed, 2005, p. 94-105.
- RAHMAN, H.; CHAKRABORTY, A.; RAHMAN, T. *et al.* Clostridial myonecrosis clinically resembling black quarter in an Indian elephant (*Elephas maximus*). *Revue Scientifique et Technique*, v. 28, n. 3, p. 1069-75, 2009.
- RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n.4, p. 307-11, p. 2005.
- RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T. *et al.* Suggest guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, p. 393-413, 2008.
- ROOD, J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Reviews of Microbiology*, v. 52, p. 333-60, 1998.
- RUIZ, F.S.; ALESSI, A.C.; CHAGAS, C.A. *et al.* Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, n.4, p. 263-70, 2005.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M. *Clostridium perfringens* alpha toxin: characterization and mode of action. *Journal of Biochemistry*, v. 136, n.5, p. 569-74, 2004.
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, Y. *et al.* Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology*, v. 83, n.1, p. 61-69, 2001.
- SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: analysis of cross-contamination. *Anaerobe*, v. 14, n. 3, p. 190-9, 2008.
- SENDO, F.; ARAKI, Y. Regulation of leukocyte adherence and migration by glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 66, n. 3, p. 369-74, 1999.
- SMITH, L.D.S. *The pathogenic anaerobic bacteria*. 3.ed. Illinois: Springfield, 1984. 550p.
- SMITH-SLATAS, C.; BOURQUE, M.; SALAZAR, J.C. *Clostridium septicum* infections in children: a case report and review of the literature. *Pediatrics*, v. 117, n. 4, p. 796-805, 2006.

- SOJKA, J.E.; BOWERSOCK, T.L.; PARKER, J.E. *et al.* Clostridium chauvoei myositis infection in a neonatal calf. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 4, p. 201-3, 1992.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 2, p.216-34, 1996.
- SONGER, J.G. Clostridial diseases of small ruminants. *Veterinary Research.*, v.29, p.219-232, 1998.
- STERNE, M. Clostridial infections. *Brazilian Veterinary Journal*, v.137, n.5, p.443-454, 1981.
- TAMURA, Y.; KIJIMA, M.; HAMAMOTO, K. *et al.* Partial characterization of the hemolysin produced by *Clostridium chauvoei*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 137, n. 5, p. 777-8, 1992.
- TELLEZ, G.; PUMFORD, N.R.; MORGAN, M.J. *et al.* Evidence for Clostridium septicum as a primary cause of cellulitis in commercial turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* v.21, n.3, p. 374-377, 2009.
- TITBALL, R.W.; NAYLOR, C.E.; BASAK, A.K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe*, v.5, n.2, p.51-64, 1999.
- TITBALL, R.W. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*, v.27, p. d-44-7, 2009.
- TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUM, P.E. *et al.* Genus Clostridium: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. European Concerted Action, 2006. 214p.
- TIZARD. I.R. *Imunologia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 01-10.
- TWETEN, R.K. Clostridium perfringens beta toxin and Clostridium septicum alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v. 82, p. 1-9, 2001.
- UZAL, F.A.; BELAK, K.; RIVERA, E. *et al.* Bacillary haemoglobinuria diagnosis by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. *Journal of Veterinary Medicine serie B*, v. 39, n. 8, p. 595-8, 1992.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L. *et al.* PCR detection of Clostridium perfringens producing different toxins in faeces of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, n.5, p.339-44, 1997.
- VANELLI, S.A.; UZAL, F.A. Clostridium septicum detection by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep. *Archivos de Medicina Veterinária*, v.28, n.2, p. 125-7, 1996.
- VERPOORT, J.A.; JOUBERT, F.J.; JASEN, B.C. Studies on the soluble antigen and haemolysin of Clostridium chauvoei strains. *African Journal of Agriculture Science*, v. 9, p.153-72, 1966.
- VAN VLEET, J.F.; VALENTINE, B.A. Muscle and tendon. In JUBB, K; PALMER'S (Ed. Maxie, M. G.) *Pathology of domestic animals*. 5. ed. Toronto: Elsevier Saunders, 2007.p.185-279.
- XU, Y.J.; SAINI, H.K.; ZHANG, M. *et al.* MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovascular Research*, v. 72, n.1, p. 163-74, 2006.
- WILLIAMS, B.M. Clostridial myositis in cattle: bacteriology and gross pathology. *Veterinary Record*, v. 100, n.5, p. 90-1, 1977.
- WELCH, W.H.; NUTTALL, G.H.F. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov. Spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* v. 3, p. 81-91, 1982.