

**Ana Izabel Passarella Teixeira**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE CLOSTRÍDIOS HISTOTÓXICOS**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

**Belo Horizonte**

**UFMG - Escola de Veterinária**

**2012**

Teixeira, Ana Izabel Passarella, 1984-  
T266d            Desenvolvimento de uma PCR Multiplex para identificação de clostrídios  
histotóxicos /

Ana Izabel Passarella Teixeira. – 2012.  
57 p. : il.

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

Inclui bibliografia

1. Clostridium – Identificação – Teses. 2. Reação em cadeia de polimerase – Teses.  
I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de  
Veterinária. III. Título.

CDD – 616.931

Dissertação defendida e aprovada em 27 de abril de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



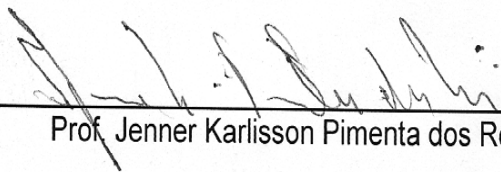
---

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Presidente



---

Prof. Ronnie Antunes de Assis



---

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e pela força para continuar, sempre.

Aos meus pais, meu irmão pelo apoio para concretização de mais um sonho.

Ao professor Francisco que me acolheu e me apoiou, apesar de todas as dificuldades, para a concretização deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa Aplicada (Felipe, Rodrigo, Phriscylla, Luciana, Guilherme, Monique, Carlos, Marina, Juliana, Amanda, Lucas). A convivência com vocês foi extremamente importante para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela paciência.

Aos meus amigos Lorena, Keila, Bruno, Irapuan, Marcos que apesar da distância, vocês sempre estiveram presentes no meu cotidiano e nos meus pensamentos.

Aos amigos que fiz nesta cidade, saibam que vocês tornaram meus dias mais leves.

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

*“Se você pensa que a educação custa caro, tente a ignorância.”*

Derek Bok

---

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>11</b>
2.1. O Gênero <i>Clostridium</i> .....	11
2.2. Clostrídios causadores de mionecrose.....	12
2.3. As mionecroses.....	19
2.4. Diagnóstico.....	22
2.5. Profilaxia.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Local de Realização do Experimento.....	27
3.2. Amostras de Referência.....	27
3.3. Meios de Cultura.....	27
3.4. Cultivo e Identificação das Amostras.....	27
3.5. Reação em Cadeia de Polimerase.....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1. Cultivo, identificação e extração de DNA das amostras.....	30
4.2. Padronização das reações de PCR.....	35
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO I: Myonecrosis by <i>Clostridium septicum</i> in a dog, diagnosed by a new Multiplex-PCR method.....</b>	<b>49</b>

---

---

### LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre as características bioquímicas das Grandes Citotoxinas Clostridiais produzidas pelo <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium sordellii</i> e <i>Clostridium novyi</i> tipo A.....	16
<b>Tabela 2</b> - Classificação dos tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i> de acordo com a presença dos genes codificadores das toxinas principais.....	18
<b>Tabela 3</b> - Iniciadores utilizados nas PCR <i>Monoplex</i> e <i>Multiplex</i> para a amplificação dos genes: <i>tpi</i> ( <i>Clostridium sordellii</i> ), <i>cpA</i> ( <i>Clostridium perfringens</i> ), <i>fliC</i> ( <i>Clostridium chauvoei</i> ), <i>fliC</i> ( <i>Clostridium septicum</i> ) e <i>fliC</i> ( <i>Clostridium novyi</i> tipo A).....	29
<b>Tabela 4</b> - Concentrações ideais dos reagentes utilizados em cada <i>Monoplex</i> para a amplificação parcial dos genes <i>tpi</i> ( <i>Clostridium sordellii</i> ), <i>cpA</i> ( <i>Clostridium perfringens</i> ), <i>rrnA</i> ( <i>Clostridium chauvoei</i> ), <i>fliC</i> ( <i>Clostridium septicum</i> ) e <i>fliC</i> ( <i>Clostridium novyi</i> tipo A) .....	36
<b>Tabela 5</b> – Temperaturas ideais em cada etapa das PCR para amplificação parcial dos genes <i>tpi</i> ( <i>Clostridium sordellii</i> ), <i>cpA</i> ( <i>Clostridium perfringens</i> tipo A), <i>fliC</i> ( <i>Clostridium novyi</i> tipo A) <i>fliC</i> ( <i>Clostridium septicum</i> ), <i>rrnA</i> ( <i>Clostridium chauvoei</i> ).....	37
<b>Tabela 6</b> – Concentrações ideais dos agentes utilizados na PCR <i>Multiplex</i> para amplificação simultânea e parcial dos genes dos cinco clostrídios histotóxicos.....	39

---

### LISTA DE IMAGENS

---

<b>Figura 1</b> - Placas de petri com ágar sangue e que apresentaram crescimento microbiano após inoculação e incubação em ambiente de anaerobiose.....	32
<b>Figura 2</b> - Esfregaços das colônias obtidas nas placas de ágar sangue e submetidas a coloração de Gram.....	34
<b>Figura 3</b> – Fotodocumentação de eletroforese em gel de agarose da PCR <i>Multiplex</i> com material genético de referência para identificação de genes constitutivos de clostrídios histotóxicos.....	40
<b>Figura 4</b> – Eletroforese em gel de agarose com material genético obtido das amostras de referência utilizadas para teste de especificidade.....	40

---

## RESUMO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se destacado nos últimos anos como uma importante técnica para identificação de microrganismos por ser extremamente sensível e versátil. Porém, até então não existia uma PCR *Multiplex* que fosse capaz de identificar os cinco agentes etiológicos causadores de mionecroses clostridiais: *Clostridium septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. Portanto, nesse trabalho foi desenvolvida uma PCR *Multiplex* para a detecção e discriminação dos clostrídios histotóxicos. A sensibilidade analítica obtida foi de aproximadamente 0,15 ng para *C.chauvoei* e 0,015 ng para outros agentes. Não aconteceram amplificações no teste de especificidade com as espécies *Clostridium tetani* (ATCC 9441), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27707), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25319), *Escherichia coli* (ATCC 21986), *Clostridium difficile* (ATCC 9689), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) e *Salmonella typhi* (ATCC 9992V) , confirmando-a. Este trabalho apresenta uma PCR *Multiplex* eficiente e específica para detecção e identificação de clostrídios histotóxicos.

**Palavras –chave:** PCR *Multiplex*, mionecroses, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A

## ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) has emerged in recent years as an important technique for identification of microorganisms to be extremely sensible and versatile. This work was the development of a multiplex PCR for the detection and discrimination of histotoxic clostridia. The analytical sensitivity obtained was approximately 0.15 ng for *C.chauvoei* and 0.015ng for other agents. No amplification occurred in the test of specificity for species *Clostridium tetani* (ATCC 9441), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27707), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25319), *Escherichia coli* (ATCC 21986), *Clostridium difficile* (ATCC 9689), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) and *Salmonella typhi* (ATCC 9992V), confirming it. This paper presents an efficient and specific multiplex PCR for detection and identification of clostridia histotoxics.

**Keywords:** Multiplex PCR, mionecrosis, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* type A, *Clostridium perfringens* type A

## 1 INTRODUÇÃO

As clostridioses são doenças causadas por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, caracterizadas como bacilos Gram positivos que podem formar esporos permanecendo potencialmente infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para as populações animal e humana. As clostridioses comportam-se durante surtos com morbidade variável, mas com letalidade próxima a 100% e são responsáveis por grandes perdas econômicas no país (Ferreira *et al.*, 2008).

Embora mais de 200 espécies de clostrídios sejam reconhecidas, aproximadamente 20 são patogênicas. As espécies patogênicas podem ser agrupadas em quatro categorias: neurotóxicos, que afetam a função neuromuscular sem indução de lesão tecidual observável; histotóxicos, que produzem lesão tecidual e subseqüentemente podem causar toxemia; o terceiro grupo são os que causam lesão inflamatória no trato gastrointestinal juntamente com enterotoxemia; e enfim, hepatotóxicos que causam doenças como a hemoglobinúria bacilar e a hepatite necrótica (Titbal *et al.*, 2006; Euzéby, 2012).

As mionecroses clostridiais são infecções necrosantes que atingem, principalmente, os tecidos musculares e subcutâneo com intensa produção de gás, sendo causadas por *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A e

*Clostridium sordellii*. Gangrena gasosa e carbúnculo sintomático são as duas principais doenças desse grupo e causam grande prejuízo na pecuária brasileira tanto que no período de 1990 a setembro de 2011 ocorreram 15.338 casos de mionecrose no estado de Minas Gerais<sup>1</sup>.

O diagnóstico das mionecroses tem sido baseado nos achados clínicos, como dificuldade de locomoção, depressão, claudicação e achados de necropsia, pela visualização das áreas lesadas edematosas, crepitantes devido à intensa produção de gás e de coloração vermelha escura. O diagnóstico laboratorial tradicional era baseado no cultivo e isolamento dos microrganismos envolvidos, mas esses processos são caros, lentos e necessitam de uma coleta e dependem da viabilidade da amostra.

A imunofluorescência direta (IFD) é o teste padrão ouro utilizado no diagnóstico de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, podendo ser realizado em impressões obtidas diretamente dos materiais suspeitos e em esfregaços de culturas puras. Entretanto, essa técnica requer amostras frescas, bem como microscópio específico e reagente não disponível usualmente na maioria dos laboratórios, e tem a sua especificidade comprometida visto que os anticorpos são direcionados contra a parede bacteriana e podendo ocorrer algumas reações cruzadas entre os principais clostrídios envolvidos.

---

<sup>1</sup> Comunicação Pessoal. Graciene Alves 2011. Instituto Mineiro de Agropecuária, IMA/MG.

Outra técnica empregada no diagnóstico, a imunohistoquímica, permite detectar antígenos *in situ* mediante o emprego de anticorpos específicos e moléculas marcadoras. Apresenta como vantagem a utilização de materiais fixados em formol assim diminuindo a barreira entre o tempo de coleta e o processamento da amostra. A ampliação desse prazo, sem prejuízo da amostra coletada, é de extrema importância em medicina veterinária, pois grande parte das propriedades rurais está distante dos centros de diagnóstico e pesquisa do país. Entre as desvantagens pode-se citar a necessidade de mão de obra especializada e o tempo de processamento da amostra.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se destacado nos últimos anos como uma técnica viável para identificação de microrganismos por ser extremamente versátil, podendo identificar os agentes em culturas, espécimes clínicos frescos, tecidos fixados em formol e incluídos em parafina. Nesse sentido, esse trabalho visa desenvolver uma PCR *Multiplex* para a detecção e identificação dos clostrídios histotóxicos e fornecendo, portanto, uma importante ferramenta de diagnóstico, já que ainda não existe uma PCR que identifique todos os clostrídios causadores de mionecroses.

## **2 LITERATURA CONSULTADA**

### **2.1 O gênero *Clostridium***

As clostridioses são as infecções e intoxicações que são desencadeadas por bactérias do gênero *Clostridium* que são classificadas como bacilos, Gram positivos, anaeróbios, ubiqüitários, têm a habilidade de passar por uma forma de resistência denominada esporo e podem permanecer infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para saúde da população animal e humana (Titball *et al.*, 2006).

Devido à característica de serem ubiqüitários, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a identificação dos clostrídios em amostras de solo, as relações entre espécies, a presença de resíduos orgânicos e biodiversidade. De forma geral, existe uma maior presença de clostrídios em áreas de maior biodiversidade e em locais de despejo de resíduos de origem animal, ou próximos a locais de alta concentração de animais, e a sua distribuição no solo pode ser afetada ou não pelo pH (Gamboa *et al.*, 2005; Sathish e Swaminathan, 2009).

As toxinas são os principais fatores de virulência das bactérias patogênicas do gênero *Clostridium*, sendo produzidas quando estes microrganismos encontram condições adequadas para o seu crescimento e produzem toxinas (Popoff e Bouvet, 2009; Bryant e Stevens, 2010; Sengupta e Alam, 2011).

As clostridioses podem ser separadas em quatro grupos distintos, com base em como se desenvolvem os processos infecciosos: grupo das

mionecroses, causadas pelos clostrídios histotóxicos: *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A, que são afecções em que os agentes multiplicam-se na musculatura e tecido subcutâneo, com produção de gás, resultando em um quadro de toxemia. As enterotoxemias, cujos agentes etiológicos são *C. perfringens* A-E, *C. difficile*, *C. septicum* e *C. sordellii* ocorrem quando estes se multiplicam no trato gastrointestinal dos homens e animais produzindo toxinas que causam o quadro nosológico; doenças hepáticas, como a hepatite necrótica e hemoglobinúria bacilar causadas pelo *C. novyi* tipo B e *C. haemolyticum*. Por último, o grupo das doenças neurotrópicas, causadas pelas toxinas do *C. tetani* e *C. botulinum* que afetam primariamente o sistema nervoso (Sterne & Batty, 1975; Titball *et al.*, 2006).

Atualmente existem diversas linhas de pesquisa trabalhando com as bactérias desse gênero, não apenas estudos relacionados à etiopatogenia desses microorganismos, mas pesquisas sobre terapias, como a toxina do *Clostridium botulinum*, utilizada para o tratamento de blefaroespasmos, hemiplegia facial, distonia cervical, enxaquecas através do bloqueio neural (Daked *et al.*, 2010; Chankrachang *et al.*, 2011).

Quando estas bactérias se desenvolvem aumentam as zonas de hipóxia envolta do tumor prejudicando o desenvolvimento do mesmo e estimulando a resposta imune, com a vantagem de poderem ser eliminadas facilmente com antibióticos ao fim do tratamento. A estirpe não

toxigênica de *C. novyi* é a que tem demonstrando maior potencial para tratamento de grandes tumores em coelhos e camundongos através de injeções subcutâneas, atuando apenas nos tumores e são eliminados sem que os pacientes apresentem quaisquer sinais de septicemia. Desta forma o gênero *Clostridium* tem tido uma grande importância dentro da ciência (Dang *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2005; Maletzki *et al.*, 2011).

## 2.2 Clostrídios causadores de mionecroses

### 2.2.1 *Clostridium septicum*

Isolado em 1877 por Pasteur e Joubert durante observações de patogenia do anthrax, esse microorganismo foi inicialmente denominado de *Vibrion septique*. O isolamento foi realizado a partir da coleta de sangue de animais que vieram a óbito suspeito por anthrax, com posterior inoculação em cobaias (*Cavia porcellus*), que desenvolveram uma intensa inflamação dos músculos abdominais com grande produção de gás entremeando o tecido afetado. Foi observada a presença de inúmeros bacilos alongados, que ao entrar em contato com o ar, entravam para um estado de latência, sob a forma esporos (Hatheway, 1990).

*C. septicum* é um bacilo Gram positivo, anaeróbico estrito, móvel, formador de esporos, altamente patogênico e frequentemente identificado em casos de mionecroses. É um microorganismo saprófito, de distribuição mundial, podem ser encontrado no solo, trato

gastrointestinal de humanos e animais. Quando cultivado em ágar sangue, as colônias são hemolíticas e úmidas, com crescimento disperso, e, à coloração de Gram, são bastonetes positivos, longos e filamentosos formando grandes cadeias (Quinn, 2005; Kennedy *et al.*, 2009).

Este microrganismo apresenta vários fatores de virulência envolvendo a produção de toxinas. Estudos indicam que *C. septicum* produz quatro toxinas principais: a alfa que tem ação hemolítica e necrotizante, a beta que tem função de DNase, a gama hialuronidase e a delta, uma hemolisina (Ballard *et al.*, 1992; Knapp *et al.*, 2010).

A toxina alfa é um fator de virulência essencial para esse microrganismo, já que o gene *csa*, codificador desta toxina, afeta a virulência da amostra quando alterado ou deletado (Kennedy *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2010). Esta toxina é secretada na forma inativa, como uma protoxina de 46,4 KDa, que se liga a membrana das células-alvo e é ativada pelas proteases do hospedeiro (Gordon *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2009). Quando ativada forma poros na membrana plasmática induzindo morte celular. Esse processo é caracterizado por um arredondamento celular, liberação de íons de potássio e aumento de cálcio intracelular, indução de uma resposta inflamatória e esgotamento das moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Portanto, a toxina exibe sua atividade lítica e citotóxica devido à alteração da permeabilidade celular. Causa perda massiva de fluidos do sistema circulatório, devido a sua ação primária no endotélio das vênulas, podendo

resultar em choque toxêmico (Kennedy *et al.*, 2009).

Para a verificação da patogenia desse agente, um experimento no qual cobaias (*Cavia porcellus*) foram inoculados via intramuscular com *C. septicum*, pôde-se observar um acentuado aumento de volume da coxa, perna e pata, correspondentes ao local inoculado, que à palpação encontrava-se crepitante, com a pele tensionada como consequência da intensa quantidade de gás. Ao corte, observou-se extravasamento de líquido vermelho intenso com bolhas de gás e intensa hemorragia do subcutâneo. Os músculos afetados apresentavam hemorragia intensa, enfisematosos (tanto que as fâscias estavam separadas) e com áreas cinzas indicando regiões de necrose. Foi possível observar petéquias, equimoses e sulfusões no peritônio e pleura parietal, com acúmulo de líquido hemorrágico na cavidade peritoneal e na região torácica ventral, observou-se intensa hemorragia e edema com áreas acinzentadas nos músculos costais (Pires, 2011).

### **2.2.3 *Clostridium chauvoei***

Em 1880, Arloing, Cornevin e Thomas descreveram pela primeira vez *Clostridium chauvoei* com mais detalhes, conseguindo isolar a partir de material coletado em surtos, culturas puras. Quando cultivadas em ágar sangue, as colônias apresentam nítidas zonas de hemólise. Com a coloração de Gram, pôde-se identificar bastonetes de tamanho médio com alguns

apresentando endósporo em forma de limão (Hateway, 1990; Quinn, 2005).

*C. chauvoei* é agente etiológico do carbúnculo sintomático e da gangrena gasosa. Essa doença era inicialmente confundida com o carbúnculo hemático. Diversas características fazem este microrganismo muito semelhante ao *C. septicum*, tais como padrão de toxinas secretadas e seus modos de ação, apresentando similaridade de 99,3% com base na subunidade 16S (Kuhnert *et al.*, 1996) e dificuldades no isolamento microbiano, pois apresentam características de crescimento e bioquímicas extremamente semelhantes. Entretanto, a diferença entre esses microrganismos reside na antigenicidade das toxinas, sendo comprovado que não existe relação antigênica entre as proteínas de *C. chauvoei* e de *C. septicum* (Ballard *et al.*, 1992).

Os esporos de *C. chauvoei* podem permanecer viáveis no solo durante muito tempo, afetando principalmente o gado bem alimentado e com faixa etária de até três anos. Após a morte desses animais pode-se isolar o agente no local onde pastejavam, no intestino e em diversos tecidos, especialmente na musculatura esquelética. Também pode ser isolado em áreas de abatedouros, como nas salas de matança, no chão e sala de dessorça (Useh *et al.*, 2006; Sathish & Swaminathan, 2008).

Diferentemente das demais bactérias causadoras de mionecroses, poucos estudos foram realizados 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), DNase (toxina beta), hialuronidase (toxina gama), hemolisina oxigênio-lábil e neuraminidase, consideradas importantes fatores de virulência (Sathish e Swaminathan, 2008).

As primeiras descrições da toxina alfa datam de 1959 (Moussa) e 1966 (Verpoort *et al.*). Neste período foram descritas algumas atividades e funções biológicas, como atividade hemolítica em sangue de coelhos e camundongos e o comportamento da proteína frente a variações de pH e inativação. Estudos posteriores definiram que as hemácias de bovinos, ovinos e aves são altamente susceptíveis a ação dessa toxina. Além disso, essas pesquisas mostraram também que cabras, coelhos e cobaios são susceptíveis ao passo que eqüinos são resistentes. Para explicar isso foi formulada a hipótese de que essa variação de resistência era devido à presença ou ausência de receptores na membrana celular. Esta toxina de 27KDa tem sido considerada o principal fator de virulência *C. chauvoei*, com ação altamente necrosante e acredita-se que o seu mecanismo de ação envolve a formação de poros na membrana celular (Hang'ombe *et al.*, 2006; Sathish e Swaminathan, 2008).

Em um estudo realizado por Pires (2011) para averiguação do desenvolvimento da patogenia das mionecroses causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, foi realizada uma infecção experimental em cobaios (*Cavia porcellus*). Como resultado, os animais apresentaram aumento de volume, edema e crepitação na coxa

inoculada. Os músculos superficiais da região medial da perna, coxa e glútea 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, 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 e o peritônio apresentou petéquias focais distribuídas difusamente.

Outra toxina que também tem sido investigada quanto ao seu papel na patogenia do carbúnculo sintomático é a neuraminidase ou sialidase. Estruturalmente, ela é composta por dois polipeptídeos de 72kDa e sua ação pode facilitar a atuação das outras toxinas como hialuronidases e deoxiribonucleases, bem como a disseminação da infecção através dos tecidos. Podem exercer um papel extremamente importante ao degradar rapidamente componentes da membrana de células de mamíferos, clivando o ácido N-acetilneuramínico de polímeros de carboidratos, como glicoproteínas, gangliosídeos (Useh *et al.*, 2003; Vilei *et al.*, 2011).

### **2.2.3 *Clostridium sordellii***

*Clostridium sordellii* foi isolado pela primeira vez em 1922, pelo microbiologista argentino Alfredo Sordelli, sendo denominado *Bacillus oedematis sporogenes* devido a sua morfologia e que durante o processo infeccioso ocorre um

edema característico. Em 1927 passou a ser conhecido como *Bacillus sordellii*. Dois anos mais tarde, recebeu o nome de *Clostridium oedematoides* e depois recebeu a nomenclatura atual. Quando cultivado em ágar sangue apresenta colônias opacas a translúcidas podendo apresentar zonas de hemólise (Aldape *et al.*, 2006) e na coloração de Gram se apresentam como bastonetes pequenos com esporos cilíndricos que não alteram o formato das células. É encontrado no solo e no intestino de diversos animais, inclusive o homem (Quinn, 2005).

*C. sordellii* produz sete diferentes tipos de toxinas: toxina letal (LT); toxina hemorrágica (HT); hemolisina; neuraminidase; hialuronidase; collagenase; fosfolipase C e DNase. A LT é extremamente citotóxica, sendo que a sua dose letal mínima é de apenas 5ng/kg. A HT tem dose letal mínima em 75 ng/kg, sendo estas duas os principais fatores de virulência do *Clostridium sordellii* (Geny *et al.*, 2007; Guttenberg *et al.*, 2011).

Em um estudo sobre a patologia deste agente, um grupo de cobaios (*Cavia porcellus*) foi inoculado com uma suspensão de esporos. Os animais apresentaram aumento da perna que foi inoculada, com intensa produção de gás. Ao corte, foi possível observar extravasamento de líquido hemorrágico que estava distribuído por todo o tecido subcutâneo. As fâscias e os feixes musculares estavam separados devido a intensa presença de gás. Assim como o edema, a hemorragia e a necrose muscular estenderam-se

por toda a musculatura ventral do animal (Pires, 2011).

Ambas pertencem ao grupo das grandes citotoxinas clostridiais (GCC). Nesse grupo estão incluídas as toxinas A e B de *Clostridium difficile* e a toxina alfa de *Clostridium novyi* tipo A, as quais apresentam como características em comum: massa molecular variando de 250 a 308 kDa e uma similaridade nas suas composições variando de 26 a 76%. Todas as toxinas desse

grupo apresentam atividade de glicosiltransferase, utilizando UDP-glucose ou N-acetilglucosamina como co-substrato para modificar os sinalizadores celulares de GTPase (Roc, Ras, Rac). Esses sinalizadores controlam diversas funções celulares, como o ciclo celular, transcrição gênica e apoptose (Geny *et al.*, 2007; Guttenberg *et al.*, 2011). A tabela abaixo apresenta algumas comparações entre essas toxinas.

Tabela 1 – Comparação entre as características bioquímicas das Grandes Citotoxinas Clostridiais produzidas pelo *Clostridium difficile*, *Clostridium sordellii* e *Clostridium novyi* tipo A

Espécie	Toxina	Peso (KDa)	Atividade Enzimática	Substrato (Receptores)	Atividade Enterotóxica	Hemo - aglutinação	Aumento da Permeabilidade Vascular
<i>C. difficile</i>	TcdA <sup>1</sup>	308	UDP-Glucose	Rho, Rac, Cdc 42	Presente	Presente	Presente
	TcdB <sup>2</sup>	269	UDP-Glucose	Rho, Rac, Cdc 42	Ausente	Ausente	Presente
<i>C. sordellii</i>	LT <sup>3</sup>	260	UDP-Glucose	Rac, Ras, Rap, Ral, Cdc42	Ausente	Ausente	Presente
	HT <sup>4</sup>	300	UDP-Glucose	Rho, Rac, Cdc 42	Presente	Presente	Presente
<i>C. novyi</i> tipo A	Toxina alfa	250	UDP-Glucose	Rho, Rac, Cdc 42	Ausente	Ausente	Presente

1- Toxina A; 2 – Toxina B; 3 – Toxina Letal; 4 – Toxina Hemorrágica  
Fonte: Adaptado de Popoff & Bouvet (2009)

O mecanismo de ação deste grupo de toxinas consiste em modificações das proteínas dos receptores de GTPases (Rho, Rac, Ras). Essas proteínas regulam os processos celulares como a formação do citoesqueleto celular, ativação de enzimas (Jank & Aktories, 2008).

Considerando as relações patógeno-hospedeiro, as GTPases controlam as funções de barreira celular, como migração de células de defesa, adesão, fagocitose, produção de superóxidos e expressão de citocinas. Tais alterações impedem

que essas sinalizações celulares ocorram. O modo de ação dessa classe de toxinas foi esquematizado em um modelo A-B-C. A primeira parte, a A, se liga a membrana celular e assim a toxina é endocitada, dentro do lisossomo sofre alterações conformacionais com a ação do pH, consequentemente a parte B formam um poro no lisossomo e por fim, a parte C da toxina é liberada no citosol da célula. Essa porção da toxina sofre clivagem e pela via UDP-Glucose atinge os receptores de GTPases

interferindo no metabolismo e estrutura celular (Jank & Aktories, 2008).

#### 2.2.4 *Clostridium novyi* tipo A

As primeiras descrições da patogenia de *Clostridium novyi*, anteriormente conhecido como *Bacillus oedematiens*, foram realizadas por Novy em 1894. Essas observações foram feitas por meio de um experimento realizado com cobaias (*Cavia porcellus*) que vieram a óbito com sintomas de gangrena gasosa. As dificuldades no isolamento e identificação deste microrganismo fizeram que ele não fosse, por muito tempo, reconhecido como importante causador de gangrena gasosa. No entanto, a alta taxa de mortalidade de soldados por gangrena gasosa durante as guerras mundiais levou a um aumento do estudo desta doença e consequentemente desse microrganismo (Aub *et al.*, 1946; Hatheway, 1990).

*C. novyi* apresenta um crescimento fastidioso e é extremamente sensível a exposição de oxigênio. Deve-se tomar bastante cuidado no seu cultivo, utilizando apenas meios frescos. Em ágar sangue, as colônias se apresentam grandes, com uma zona de hemólise, variando com o tipo de toxina produzida. Quando submetidas à coloração de Gram são observados: bastonetes grandes com esporos ovais a cilíndricos, subterminais, que formam uma ligeira protuberância na célula (Hatheway, 1990; Quinn *et al.*, 2005). Esse microrganismo é classificado em quatro tipos, de acordo com a

produção de toxinas. O tipo A produz apenas a toxina alfa sendo o agente da gangrena gasosa em humanos e animais domésticos. O tipo B produz, além da alfa, a toxina beta. O tipo C não produz toxinas e o tipo D, hoje denominado *Clostridium haemolyticum*, causa a hemoglobinúria bacilar em bovinos produzindo uma toxina hemolítica e necrotizante (Songer, 1998).

A toxina alfa de *C. novyi* tem ação citotóxica e necrotizante e é frequentemente implicada na patogenia da gangrena gasosa. Por apresentar 48% de similaridade com as toxinas A e B de *C. difficile* e 34% com as toxinas Letal e Hemorrágica de *C. sordellii*, bem como modo de ação semelhante, faz parte do grupo das grandes toxinas clostridiais (Hatheway, 1990; Schirmer & Aktories, 2004; Guttenberg *et al.*, 2011).

A dose letal (DL<sub>50</sub>) é de aproximadamente 200ng/kg quando injetada intravenosamente em cobaias e causa a morte por extravasamento de fluido para o espaço intersticial e cavidade abdominal levando a morte por choque hipovolêmico. Pela via intramuscular, o local pode apresentar edema, necrose e crepitação que se estende por toda região ventral do animal. Em diversas culturas de células a toxina alfa apresenta citotoxicidade alterando o formato da célula e danificando o citoesqueleto por meio da interferência nos receptores de GTPases. Este é o mecanismo de ação que melhor caracteriza a classificação deste grupo de toxinas (Selzer *et al.*, 1996; Pires, 2011).

### 2.2.5 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* foi descrito, pela primeira vez, por Welch e Nuttal em 1892. Apresenta distribuição mundial sendo encontrado no solo, lúmen intestinal de animais e humanos. Quando cultivado em ágar sangue produz dupla hemólise, já em ágar gema de ovo, leva a um aumento da turbidez como resultado da digestão da lecitina. Na coloração de Gram são identificados como bastonetes grandes e largos. Apresenta relativa aerotolerância e rápida taxa de crescimento (Hatheway, 1990; Titball *et al.*, 1999; Quinn, 2005).

É um agente etiológico de grande importância médica por causar graves doenças em seres humanos e animais. Entre essas doenças pode-se citar: gangrena gasosa, intoxicação alimentar e enterite necrótica. Essa capacidade de causar doenças está associada à variada produção de exotoxinas. Apesar de existir 13 toxinas descritas, a classificação das estirpes desse microorganismo está associada a cinco principais toxinas: alfa, beta, epsilon, iota e a enterotoxina (Sengupta & Alam, 2011).

Em 1931, Wildson e colaboradores definiram quatro tipos toxigênicos: A, B, C e D; por meio do estudo da ação das toxinas *in vivo*. Com um filtrado de toxinas e soros anti-toxinas, descobriram que o soro anti-A protegia apenas contra as toxinas do filtrado A, o soro anti-B neutralizava os quatro filtrados de toxinas, o soro anti-C neutralizava todos, exceto o D, e o anti-D neutralizava apenas os filtrados de toxinas A e D. Assim conclui-se que *C. perfringens* possuía diversos tipos toxigênicos. O quinto tipo, o E, foi estabelecido apenas em 1943, quando Bosworth isolou uma estirpe cuja toxina não podia ser neutralizada por soros das outras estirpes. A enterotoxina foi descoberta há cerca de quase 40 anos, sendo relacionada à intoxicação alimentar causada por *C. perfringens* tipo A (Hatheway, 1990; Adak *et al.*, 2002).

Estudos dos genes codificadores dessas toxinas, conduzidos em 1996 por Songer e Meer, propuseram uma classificação genotípica dos tipos toxigênicos de *C. perfringens*. Essa classificação está apresentada na tabela abaixo.

Tabela 2 – Classificação dos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* de acordo com a presença dos genes codificadores das toxinas

Tipos Toxigênicos	Genes Codificadores das Toxinas				
	<i>cpa</i> (alfa)	<i>cpb</i> (beta)	<i>cpb2</i> (beta2)	<i>Etx</i> (enterotoxina)	<i>ia</i> (iota)
A	+	-	+	+	-
B	+	+	-	+	-
C	+	+	+	+	-
D	+	-	-	+	-
E	+	-	-	+	+

Adaptado de Viera (2006)

*C. perfringens* tipo A é o mais expressivo nos casos de gangrena gasosa, por produzir altas concentrações da toxina alfa. Possui DMM (dose mínima mortal) menor do que 0,1µg/camundongo e sua atividade biológica foi classificada em duas categorias: fosfolipase C (PLC) e esfingomielase, mas já foi comprovado que induz a degradação de fosfolipídeos em geral. Provoca morte celular pela clivagem dos componentes da membrana e como consequência da ação ocorre hemólise intravascular, danos capilares, com redução da perfusão sanguínea, agregação plaquetária, diminuição da oxigenação nos tecidos favorecendo a necrose local e a multiplicação dos clostrídios. Também está associada com estase de neutrófilos nos capilares próximos e acredita-se que seja causada por danos ao endotélio vascular, impedindo assim a transmigração dessas células. Esse processo culmina em choque tóxico e óbito (Titbal *et al.*, 2006; Hickey *et al.*, 2008; Urbina *et al.*, 2011).

Outra toxina de *C. perfringens* tipo A descrita nos casos de mionecrose é a teta. É classificada como uma perfringolisina colesterol-dependente. Apresenta-se na forma binária: parte dela se liga a molécula de colesterol localizada na membrana do hospedeiro, e a outra parte forma poros na membrana, causando a lise celular. Apesar de não ser necessária para tornar o processo infeccioso letal, contribui para a patogênese da mionecrose modulando a resposta imune e inibindo o mecanismo de citotoxicidade mediado por macrófagos (Hickey *et al.*, 2008; Nagahama *et al.*; 2011).

## 2.3 As Mionecroses

### 2.3.1 Carbúnculo Sintomático

Até 1870, carbúnculo sintomático era considerada uma forma específica de *anthrax*, conhecido como “anthrax sintomático”. Arloing e colaboradores, em 1879, demonstraram que essa doença tinha outro agente etiológico, que hoje é conhecido como *C. chauvoei* (Armstrong & MacNamee, 1950).

*Clostridium chauvoei* está amplamente distribuído no solo e trato intestinal dos herbívoros. A sobrevivência desse microrganismo no solo sob a forma de esporos é o fator mais significativo para a transmissão aos bovinos, já que a ingestão de pastos contaminados constitui-se na principal fonte de infecção (Gyles, 1993).

Várias espécies podem ser infectadas, mas os bovinos são os mais acometidos e para essa espécie a infecção é “endógena” (Sterne & Batty, 1975; Useh, 2002). Os animais ingerem os esporos dispersos no solo durante o pastejo, comprovado pelo isolamento da bactéria no intestino, fígado, e intestino de animais saudáveis em abatedouros, (Useh *et al.*, 2006; Sathish & Swaminathan, 2008).

Existem duas formas de manifestação do carbúnculo sintomático nos bovinos. A forma clássica, de ocorrência mais freqüente, afeta principalmente a musculatura esquelética,

enquanto a visceral, raramente encontrada, afeta, principalmente, o coração (Uzal *et al.*, 2003). A verdadeira patogenia do carbúnculo sintomático em bovinos, tanto a clássica como a visceral, é ainda incerta. Na clássica, a hipótese corrente é que os esporos presentes no intestino são veiculados por macrófagos até a musculatura onde permanecem em latência. O estímulo para que ocorra o desenvolvimento dessas bactérias não está bem estabelecido, mas sabe-se que o animal vem a óbito de 12 a 36 horas após o início dos sintomas, devido à acelerada multiplicação celular com produção de toxinas. Em ovinos, a doença é “exógena” se desenvolvendo rapidamente após a contaminação de feridas provenientes de castrações, vacinações e outras intervenções realizadas em condições não assépticas (Buxton & Donachie, 1990; Assis *et al.*, 2004).

Apesar da falta de dados econômicos sobre as perdas relacionadas, essa doença é considerada uma das maiores fontes de prejuízo aos produtores de gado. Apesar de ter uma distribuição mundial, é considerada endêmica em algumas regiões, como em alguns países da África, como na Nigéria onde os prejuízos devido ao carbúnculo sintomático foram estimados em torno de 4,3 milhões de dólares por ano no período de 2000-2005 (Useh *et al.*, 2006).

De forma geral, os surtos em bovinos tendem a ser sazonais, ocorrendo, geralmente, nos meses mais quentes do ano, especialmente após as chuvas. Os animais mais susceptíveis são os

bovinos, na faixa de idade de seis meses a dois anos, em boas condições corporais e apresentando crescimento rápido. Nas descrições da sintomatologia clínica dos animais acometidos são observados: anorexia, febre, depressão, produção de gás no tecido afetado, lesão com edema, hemorragia, necrose das fibras musculares, claudicação e morte em até 72 horas (Assis, 2005<sup>a</sup>).

### **2.3.2 Gangrena Gasosa**

No período de 1877 a 1881, Pasteur, Koch e Geffky isolaram um microrganismo que foi denominado o bacilo do edema maligno. Um ano depois, Moliere e Ponget usaram o termo “gangrena gasosa” pela primeira vez ao descrever a patogenia desta doença. Dez anos depois, Welch isolou e caracterizou outra bactéria, *Bacillus perfringens*, atual *C. perfringens* adicionando-o ao grupo dos microorganismos causadores do edema maligno, pela sua patogenia que causava e a notória capacidade de produção de gás (Goodman, 1924).

As pesquisas sobre gangrena gasosa foram impulsionadas pelo grande número de soldados que morriam desta doença em virtude das feridas de guerra. Nesta época foi feita a primeira descrição sobre a patogenia desta doença por McNee e Dunns (1917). Apesar do trabalho destes autores ter sido realizado a mais de 90 anos, as observações histológicas feitas por esses autores permanecem e alguns dos mecanismos propostos a cerca da patogenia

foram confirmados com o passar do tempo por meio do estudo da ação das toxinas. Posteriormente identificou-se que a gangrena gasosa pode ser causada por um ou pela associação dos seguintes agentes: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii* (Assis *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2002; Radostitis, 2002).

Atualmente essa doença tem sido descrita em humanos em associação com doenças, como carcinomas, infarto, diabetes e AIDS (Dylewski *et al.*, 2007). Também tem ocorrido, em pequenos surtos, entre usuários de drogas injetáveis, principalmente a heroína (CDC, 2001; Bangsberg *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2004).

Além disso, é uma doença de grande importância na produção animal, devido à alta letalidade, atingindo principalmente bovinos e ovinos. Podem ocorrer, comumente, em decorrência de feridas cirúrgicas ou acidentais, pouca assepsia na vacinação e tosquia (Assis *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2002; Radostitis, 2002). No Brasil, os agentes mais frequentemente identificados em casos de gangrena gasosa são *C. chauvoei* e *C. septicum* (Assis *et al.*, 2010) com destaque para o trabalho de Pires (2011) que aponta a espécie *C. perfringens* tipo A como um importante agente de mionecrose em bovinos no Brasil sendo o segundo mais identificado em um estudo retrospectivo.

A patogenia da gangrena gasosa já foi descrita em diversas espécies animais além de bovinos e

ovinos, como em equinos (Choi *et al.*, 2003), suínos (Pinto *et al.*, 2005), elefantídeos (Rahman *et al.*, 2009), aves (Guanxing *et al.*, 2010) e em panteras em cativeiro (De La Fe *et al.*, 2006).

Para um melhor estudo da patogenia dessa doença, pode-se dividir seu desenvolvimento em cinco etapas segundo Bryant & Stevens (2011). Em um primeiro momento, após a ocorrência de uma ferida os esporos de clostrídios podem contaminar os tecidos. Em animais, essas feridas podem ser cirúrgicas ou acidentais, decorrentes de castração, tosquia, parto, punção venosa, vacinação ou corte do cordão umbilical. (Morris *et al.*, 2002; Radostitis *et al.*, 2002). Nem todas as feridas contaminadas progredem para uma gangrena gasosa, mas se o suprimento sanguíneo é comprometido ou algum material alojado no tecido não é removido, cria-se assim um ambiente de anaerobiose que permite a proliferação microbiana. A segunda etapa ocorre quando, após a ocorrência da injúria tecidual, há uma diminuição do potencial de óxido-redução por consequência da alcalinização do meio e da decomposição de produtos protéicos. Esses fatores contribuem para penetração, germinação e intensa proliferação de clostrídios, com conseqüente produção de toxina, responsável pelo quadro patológico da doença (Lima *et al.*, 2006; Tellez *et al.*, 2009).

O terceiro estágio é quando ocorrem os primeiros sinais clínicos da doença. A sintomatologia geralmente inclui febre,

anorexia, taquicardia e depressão. As lesões macroscópicas da gangrena gasosa são semelhantes às observadas na ocorrência do carbúnculo sintomático, com ocorrência de edema crepitante nos músculos e tecido subcutâneo, que inicialmente estão quentes e doloridos. Com a evolução da doença tornam-se frios e indolores, sendo comum a ocorrência de hemorragias e necrose (Buxton & Donachie, 1991). O quarto estágio é resultado da diminuição da perfusão sanguínea nas proximidades da lesão e expansão do ambiente anaeróbio. Com a progressão do quadro clínico a sintomatologia fica mais grave, atinge-se o quinto e último estágio que é quando ocorre colapso cardiovascular e falência de órgãos, que é resultado do quadro de toxemia (Smith, 1984; Bryant & Stevens, 2011).

## 2.4 Diagnóstico

Como nos últimos anos, as espécies de *Clostridium* ressurgiram como importantes patógenos de humanos e animais, a detecção e identificação de espécies patogênicas são, portanto, crítica para clínica, diagnóstico e terapia antimicrobiana. Técnicas tradicionais de diagnóstico para clostrídios são laboriosos, demorados, e podem afetar adversamente o resultado terapêutico (Janvilisri *et al.*, 2010). Nas mionecroses clostridiais o diagnóstico é, geralmente, baseado em dados clínicos e necropsia, não sendo determinada a etiologia microbiana. Frequentemente, os animais acometidos apresentam edema com crepitação subcutânea, sinais generalizados de toxemia e,

não raramente, muitos deles morrem subitamente (Assis *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002).

Foram desenvolvidos outros métodos para o diagnóstico das mionecroses clostridiais. A imunofluorescência direta (IFD), técnica padrão ouro, empregada mundialmente, permite a identificação precisa dos agentes em esfregaços de culturas e impressões obtidas diretamente da necropsia. Entretanto, apesar de ser aplicável em tecido parafinado, não permite avaliar o estado de conservação do tecido (Assis *et al.*, 2001; Pires, 2011).

Outra técnica sorológica utilizada é a imunohistoquímica (IHQ), cujo objetivo é demonstrar a presença de antígenos em cortes de tecido por meio da utilização de anticorpos específicos, uma vez que, antígeno-anticorpo ligam-se e acontece uma reação química, com precipitação de cromógenos visíveis por microscopia de luz (Ramos-Vara *et al.*, 2005). Essa técnica tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico de mionecroses clostridiais e em estudos retrospectivos realizados em material de arquivo (Assis *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005; Assis *et al.*, 2010; Pires, 2011).

### 2.4.1 Considerações sobre a Reação em Cadeira de Polimerase

A introdução de métodos de biologia molecular nos laboratórios de diagnóstico em microbiologia possibilitou avanços no diagnóstico sensível ao substituir ou

complementar as técnicas tradicionais. De todas as técnicas moleculares disponíveis a reação em cadeia da polimerase tem adquirido um grande valor ao permitir a detecção de agentes etiológicos, bem como permitindo pesquisas em seus genes de virulência e resistência (Mendes-Alvarez & Peres-Roth, 2004).

A popularidade da técnica se deve a aparente simplicidade do protocolo com maior probabilidade de sucesso, rápida execução, fácil análise, amplificação de muitas cópias de DNA em poucas horas. Embora seja de simples execução não existe um protocolo único que sirva para todas as situações. Consequentemente a cada nova aplicação de PCR exige uma nova padronização (Lo *et al.*, 2006).

A amplificação de DNA e RNA (cDNA) foi importante para o estudo de sequenciamento, o estudo de proteínas, bem como no desenvolvimento de testes de diagnósticos. A PCR, hoje em dia, já não é mais considerada um método tão dispendioso. Porém ainda, grande parte dos laboratórios apenas o utiliza naqueles casos em que a sua aplicação é fundamental para o diagnóstico (Lo *et al.*, 2006).

A reação sempre parte de um DNA molde, extraído da amostra, ou de RNA, convertido para cDNA. De modo geral, após a desnaturação das fitas de DNA, temos o anelamento dos iniciadores. Então, a sequência a ser amplificada passa por uma etapa de extensão, na qual são feitas cópias daquela região (Lo *et al.*, 2006). Além do DNA molde, utiliza-se DNA polimerase, tampão da enzima,

cloreto de magnésio, iniciadores e desoxinucleotídeos (dNTP's). A DNA polimerase mais utilizada é a *Taq*, extraída da bactéria *Thermus aquaticus* que sintetiza DNA, realizando assim a amplificação do gene que foi delimitado pelos iniciadores. Esta enzima necessita de íons de  $Mg^{2+}$ , cofatores que viabilizam sua atividade. Os iniciadores são seqüências de DNA (12 a 35 bases) que flanqueiam a região a ser amplificada. Os dNTP's são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das "fitas-filhas". São compostos por nucleotídeos trifosfatos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose e são adicionados pela *Taq* polimerase complementarmente à fita-mãe numa área delimitada pelos iniciadores (Henegariu *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 2006).

A extração de DNA é um ponto chave no processo, pois como a quantidade necessária para que a PCR aconteça é mínima, este não pode estar fragmentado, senão os iniciadores não conseguem delimitar trecho algum e a reação não ocorre. Por essa característica de precisar de quantidades mínimas, essa técnica tem sido considerada eficiente em materiais de arquivo, como tecidos fixados em formol e incluídos em parafina e outras fontes escassas, como fios de cabelo, gotas de sangue (Sepp *et al.*, 1994. Kullman *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 2001; Simonato *et al.*, 2007).

Outro ponto chave para estabelecer um protocolo de PCR com sucesso é o desenho dos iniciadores. Este processo é dividido em várias fases: busca e escolha das seqüências de

interesse; alinhamento das seqüências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada, determinação da temperatura de anelamento média que é quando 50% dos iniciadores estão acoplados e 50% não (Garcês e Lima, 2004; Benson *et al.*, 2011).

Devido à ampla utilização em pesquisas científicas, a PCR tem apresentado algumas variações em sua execução. A reação de transcriptase reversa é feita usando com um molde que é obtido a partir de uma amostra de RNA. Essa reação de transcriptase reversa é extremamente útil em estudos de expressão gênica, pois ao avaliar o mRNA pode-se saber quais proteínas estão sendo efetivamente produzidas. A PCR *Nested* (ninho) é feita para aumentar a quantidade do produto final ou para aumentar a sensibilidade da técnica, executada essencialmente em duas partes. O produto amplificado obtido na primeira etapa é utilizado como molde para ser amplificado na segunda etapa. O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso consiste na amplificação randômica do DNA por um par de iniciadores de baixa especificidade. Essa técnica permite a tipagem do genoma de microrganismos possibilitando a comparação entre isolados de amostras clínicas. A PCR em tempo real consiste na amplificação tradicional, porém a detecção do produto é feita durante a reação através de marcadores que emitem um sinal, no qual se pode determinar a quantidade de produto amplificado (Roche, 2006).

A PCR *Multiplex* é uma variante da técnica inicial na qual dois ou mais moldes serão marcados para amplificação utilizando-se de dois ou mais pares de iniciadores, que tem grande potencial para poupar tempo e reagentes nos laboratórios, tendo sido utilizada com sucesso em diversas áreas como: análise de genes deletérios, mutações, polimorfismo e detecção de patógenos. No campo de diagnóstico de doenças infecciosas a PCR *Multiplex* tem se mostrado uma excelente ferramenta para a identificação de diferentes agentes etiológicos responsáveis por processos infecciosos multifatoriais (Markoulatos *et al.*, 2002; Deustch e Mathur, 2011).

Estabelecer um protocolo de PCR *Multiplex* não é uma tarefa fácil devido a algumas dificuldades como competição entre reagentes, baixa sensibilidade e especificidade, e amplificação preferencial de alguns fragmentos. É fundamental realizar a escolha dos iniciadores com características desejáveis como: temperaturas de anelamento médio semelhantes, tamanho dos produtos amplificados próximos e não formação de dímeros (Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al.*, 2002; Viera, 2006).

Existem diversos protocolos de PCR já estabelecidos para a identificação de clostrídios. Como as técnicas tradicionais de rotina na bacteriologia básica são laboriosas e com algumas limitações para a identificação correta dos agentes, outras técnicas têm sido exploradas e a PCR têm ganhado destaque. Os primeiros sistemas de genotipagem eram baseados nas subunidades 16S e 23S. Kunhert e

colaboradores (1997) encontraram 99,3% de similaridade entre *C. septicum* e *C. chauvoei*, no gene *rrs* da subunidade 16S. Baseados nisso, desenvolveram uma PCR para identificar apenas *C. chauvoei* em culturas e utilizaram amostras de material clínico. Foram testados dois métodos para extração de DNA das culturas: um pelo tampão de lise e o outro por meio do tiocianato de guanidina. Devido à grande similaridade entre espécies, tiveram problemas de especificidade que foram corrigidos com enzimas de restrição e conseguiram identificar o agente etiológico isolado em 77% das amostras clínicas estudadas.

Posteriormente, outro protocolo de PCR, baseado no sistema 16S-23S foi estabelecido. Este foi padronizado a partir de culturas puras e isolado de materiais clínicos, usando um tampão com lisoenzima para extrair o DNA dos cultivos em caldo. Neste protocolo, a PCR foi feita com volume final de 100µL sem a necessidade de se utilizar enzimas de restrição. Porém, os próprios autores alegaram que na tentativa de identificar os agentes clostridiais causadores de mionecrose, pode-se obter resultados falsos positivos em virtude de contaminações em seu método de extração e grande similaridade entre as espécies dentro do gênero *Clostridium* (Sasaki *et al.*, 2000). Posteriormente, no trabalho publicado em 2001 Sasaki e colaboradores, detectaram o gene *rrnA* do sistema 16S-23S que detinha a diferença gênica entre as espécies *C. septicum* e *C. chauvoei* e padronizaram uma nova PCR para identificação

de *C. chauvoei* e obtiveram melhores resultados em comparação ao trabalho do ano 2000.

Na busca por sistemas mais seguros para identificação gênica das bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Clostridium*, principalmente para identificar *C. septicum* e *C. chauvoei*, começou-se a pensar em outros genes além dos presentes no sistema 16S-23S. Para identificar o *C. septicum* foi selecionado o gene que codifica a toxina alfa. Este gene não apresenta homologia com sequências gênicas de outras espécies. O método de extração utilizado foi o de tampão de lise com lisoenzima para as colônias isoladas e para suspensões bacterianas em caldo, a extração foi por fenol-clorofórmio. A amplificação foi feita em um volume final de 100 µL. A sensibilidade analítica obtida foi de 380 UFC's em 10µL (Takeuiche *et al.*, 1997). Posteriormente, Kojima *et al.* (2001) desenvolveram uma técnica de PCR que amplificava o gene da flagelina, que indica patogenicidade. Espécies que não possuem este gene não podem ser consideradas bons antígenos vacinais. O limite de detecção obtido foi de 200 UFC em 10µL.

Trabalhando com o objetivo de identificar os genes de *C. chauvoei* e *C. septicum*, Assis e colaboradores (2008) desenvolveram uma PCR *Multiplex* capaz de detectar simultaneamente estes dois agentes. Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos nos trabalhos de Takeuiche *et al.* (1997) e Kojima *et al.* (2001). O método de extração de DNA utilizado também foi o mesmo. O protocolo foi definido em um volume final de 100µL. A sensibilidade

analítica obtida foi de 0,03ng/μL para *C. septicum* e 0,045ng/μL para *C. chauvoei*.

De acordo com dados da literatura internacional os agentes mais comuns nas mionecroses são *C. chauvoei* e *C. septicum*. A maioria PCR descritas visam identificar estes microrganismos, como a PCR descrita por Uzal *et al.* (2003) que identifica *C. chauvoei* em culturas puras e tecido fixado em formol e parafinizado. Estes pesquisadores compararam três combinações de pares de iniciadores e obtiveram resultados satisfatórios utilizando o par que amplificava o menor produto. As duas outras combinações de iniciadores funcionaram apenas quando o DNA foi extraído de culturas puras e purificado.

Técnicas de reação em cadeia da polimerase atuais, como a PCR em tempo real, também estão sendo desenvolvidas para o diagnóstico etiológico das mionecroses causadas por clostrídios, visando apenas detecção e diferenciação de *C. chauvoei* e *C. septicum*. São técnicas altamente precisas pelas quais são obtidos bons resultados, como sensibilidade analítica de 0,001 ng/μL (Lange *et al.*, 2010); 0,92 UFC/g (Neumann *et al.*, 2010); 1,79.10<sup>3</sup> células/grama de músculo (Halm *et al.*, 2010) e 0,0000001μg de DNA (Garafolo *et al.*, 2011).

Além da identificação e diferenciação de *C. chauvoei* e *C. septicum*, vêm crescendo a importância e a ocorrência de outros clostrídios como *C. perfringens* tipo A (Pires, 2011), surtos envolvendo *C. novyi* ocorrendo em associação com *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. septicum* em

ruminantes, mionecroses em panteras por *C. sordellii* e em elefantídeos por *C. perfringens* tipo A (De La Fe *et al.*, 2006; Lobato *et al.*; 2008 Rahman *et al.*, 2009). As técnicas de PCR que identificam outros agentes etiológicos do gênero *Clostridium* não são voltadas para o estudo das mionecroses, e sim para outras doenças causadas por clostrídios. Como por exemplo, estudos sobre enterites abrangendo clostrídios (Viera *et al.*, 2008; Weese, 2011), e problemas ginecológicos em mulheres (Zane & Guarner, 2011). Todas essas informações apontam para importância e necessidade do desenvolvimento de técnicas de PCR específicas para outros agentes etiológicos das mionecroses clostridiais.

## 2.5 Profilaxia

O tratamento dessas infecções é notoriamente difícil, pois as mionecroses afetam tecidos que tem a perfusão vascular diminuída, consequentemente a antibioticoterapia tem uma eficiência limitada, sendo frequentemente combinada com outras intervenções como a remoção cirúrgica do tecido afetado. Além disso, devido às características ecológicas dos agentes, que são ubiqüitários do trato gastrointestinal de animais e solo, pela forma de resistência dos esporos, a erradicação dessas patologias é praticamente impossível. O controle deve se basear em medidas profiláticas e de manejo já que os animais estão em contato permanente com os agentes e os fatores que podem desencadear as doenças (Lobato e Assis, 2000; Lobato *et al.*, 2010).

A vacinação contra as mionecroses tem sido utilizada como estratégia principal de prevenção desde o século XIX. Atualmente é considerada a medida profilática mais importante, tanto que, apenas no Brasil são produzidas e comercializadas, aproximadamente, 150 milhões de doses de vacinas por ano (Araujo *et al.*, 2010; Lobato *et al.*, 2010; Uzal, 2012).

As vacinas clostridiais são, em sua maioria, polivalentes, contendo em sua composição múltiplos antígenos e sendo usadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e ou toxinas. Os imunógenos devem ser aplicados preferencialmente por via subcutânea, em duas doses com intervalo de quatro a seis semanas na primo-vacinação, com reforço anual. Quando o rebanho é sistematicamente vacinado, os anticorpos colostrais protegem os animais por até quatro meses após o nascimento, sendo que então a primo-vacinação deve ser realizada nesse período (Lobato e Assis, 2000).

Como os antígenos nas vacinas contra carbúnculo sintomático e gangrena gasosa são múltiplos, faz-se necessário um controle rigoroso das vacinas por meio de testes de potência para avaliar a qualidade da proteção fornecida. Com os avanços dos estudos moleculares, as vacinas poderão ser desenvolvidas com maior eficácia, bem como os avanços em diagnóstico permitirão um maior controle dessa patologia (Vilel *et al.*, 2011).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Realização do Experimento

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, localizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG.

#### 3.2 Amostras de referência

Para a padronização das PCR *Monoplex* e *Multiplex*, foram utilizadas as amostras de referência do *American Type Culture Collection* (ATCC): *C. chauvoei* (ATCC 10092); *C. septicum* (ATCC 12464); *C. sordellii* (ATCC 9714); *C. novyi* tipo A (ATCC 19402) e *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624).

Para a realização dos testes de especificidade foram utilizadas amostras de *Clostridium tetani* (ATCC 9441); *Staphylococcus aureus* (ATCC 27707), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25319), *Escherichia coli* (ATCC 21986), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Salmonella typhi* (ATCC 9992V).

#### 3.3 Meios de Cultura

Para a ressuspensão, o cultivo e a identificação das amostras de referência foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldo de enriquecimento *Brain-Heart-Infusion* (BHI – Difco Laboratories, Detroit, EUA) e ágar sangue (AS) constituído de ágar *Muelluer-Hinton* (Difco Laboratories, Detroit, EUA)

suplementado com 5% de sangue equino desfibrinado.

### 3.4 Cultivo e Identificação das amostras

As amostras clostridiais liofilizadas foram reconstituídas com 1 mL de caldo BHI e depois semeadas em tubos com tampa de rosca, contendo 15 mL do mesmo caldo, diluído na proporção 1:16 e posteriormente incubadas em jarra de anaerobiose com uma mistura gasosa (10% de CO<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub>, 80% de N<sub>2</sub>) à 37°C, por 48 horas.

Para avaliação do estado de conservação da amostra foram feitos teste respiratório e coloração pelo método de Gram. Para o teste respiratório, foi realizado o plaqueamento em duas placas com ágar sangue. Uma das placas foi incubada em anaerobiose a 37°C por 48 horas. A outra foi incubada a 37°C em aerobiose, pelo mesmo tempo, para avaliação da pureza das amostras. As unidades formadoras de colônias, provenientes das placas incubadas em anaerobiose foram avaliadas, quanto a morfologia da colônia e pelo método de coloração de Gram (Sebald & Petit, 1997).

### 3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 3.5.1 Obtenção do DNA

Para a obtenção do material genético das amostras de referência, uma colônia característica de cada amostra obtida na placa de ágar sangue, após avaliação do teste respiratório e da morfologia, foi raspada e transferida para tubo de microcentrífuga, e em seguida

ressuspendida em 200 µL de água ultra pura esterelizada (Milli-q Plus QPack 1E, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Posteriormente, aquecidas a 98°C por 20 minutos e centrifugadas a 15.000 x G durante 5 minutos para a remoção dos debris celulares. O molde para PCR consistiu de 5 µL do sobrenadante (Adatado de Baums *et al.*, 2004).

#### 3.5.2 Controles

Os controles positivos utilizados foram os DNAs obtidos das amostras de *C. chauvoei* (ATCC 10092); *C. septicum* (ATCC 12464); *C. sordellii* (ATCC 9714); *C. novyi* tipo A (ATCC 19402) e *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624).

Como controle negativo foi utilizado água esterilizada ultra-pura, no lugar do DNA e todos os demais reagentes da PCR.

#### 3.5.3 Iniciadores

Foram utilizados cinco pares de iniciadores, dos quais três foram escolhidos por meio de uma extensa busca na literatura, para identificação de *C. septicum*, *C. novyi* tipo A e *C. chauvoei* (Sasaki *et. al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2002).

Como não foram encontrados outros iniciadores que tivessem características compatíveis com os já escolhidos e na intenção de aperfeiçoar o desenvolvimento da PCR foram desenhados dois pares de iniciadores para este trabalho (como descrito adiante), visando amplificação de pequenos produtos e com temperaturas de anelamento mais próximas dos já escolhidos.

Os desenhos foram feitos com o auxílio do programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) com ajustes apenas na seleção do tamanho do produto e faixa de temperatura de anelamento média e os outros parâmetros já predefinidos pelo programa.

Foram desenhados para identificação de *C. sordellii* com a sequência GenBank:

AY700154.1 e para *C. perfringens* tipo A com GenBank AF477009.1. Posteriormente os produtos amplificados foram analisados pela ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Tool* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação de similaridade entre os produtos amplificados com genoma de outras espécies. A tabela a seguir apresenta todos os iniciadores utilizados neste trabalho.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR *Monoplex* e *Multiplex* para a amplificação dos genes: *tpi* (*Clostridium sordellii*), *cpA* (*Clostridium perfringens* tipo A), *rrnA* (*Clostridium chauvoei*), *fliC* (*Clostridium septicum*) e *fliC* (*Clostridium novyi* tipo A)

Agente	Gene	Identificação dos Iniciadores	Sequência (5'-3')	Temperatura de Anelamento Média	Tamanho do fragmento	Referência
<i>C. sordellii</i>	<i>tpi</i>	SNF	AGAATAAACAGAGCTGGA GATG	53,7°C	101	-
		SR	ATTGGATCTATTCCAGCTT C	53,4°C		
<i>C. perfringens</i>	<i>cpA</i>	PF	AATGTTACTGCCGTTGATA G	52,9°C	236	-
		PR	CAATCATCCCAACTATGAC T	52,3°C		
<i>C. septicum</i>	<i>fliC</i>	FlaF	AGAATAAACAGAGCTGGA GATG	52,1°C	294	Sasaki <i>et al.</i> 2002
		FlaseR	TTTATTGAATTGTGTTTGG AAG	48,2°C		
<i>C. novyi</i> tipo A	<i>fliC</i>	FlaF	AGAATAAACAGAGCTGGA GATG	52,1°C	343	Sasaki <i>et al.</i> 2002
		FlanaR	CGCCTACTTGGAAAGTTAC TC	53,1°C		
<i>C. chauvoei</i>	<i>rrnA</i>	Sas_01F	GAATTA AAAACA ACTTTAA CAAATG	55,8°C	522	Sasaki <i>et al.</i> , 2001
		Sas_01R	GGATCAAGAACTCTAAAC CTTTCT	51,9°C		

### 3.5.4 Padronização de cinco PCR para identificação de clostrídios histotóxicos

Para a padronização dos testes, foram utilizadas variações nas concentrações dos reagentes: MgCl<sub>2</sub> (1,0mM, 2,0mM; 2,5mM); iniciadores (0,2μM; 0,5 μM e 0,8μM) *Taq* DNA polimerase (0,5 a 5U).

Em todas as reações foi utilizado 0,2mM de dNTPs e água ultra pura esterilizada para completar o volume final de 25μL. Todas as reações foram feitas no termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster, EUA). Foram testadas variações de temperatura de anelamento (45° a 60°C) em

cada uma das reações com o objetivo de aprimorar a sensibilidade e especificidade.

### **3.5.5 Padronização da PCR *Multiplex* para identificação simultânea das cinco espécies de clostrídios histotóxicos**

Durante a padronização do teste foram feitas variações nas concentrações dos reagentes:  $MgCl_2$  de 1,0mM, 2,0mM e 2,5mM; tampão especial de amostra 5X (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) variando de 1X, 2X e 3X; iniciadores de 0,5  $\mu$ M a 1,5 $\mu$ M e Taq DNA polimerase (3U, 4U e 5U).

Também foram feitas reações com o tampão especial IVB 5X (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) de 1X 2X e 3X. Em todas as reações foi utilizado 0,2mM de dNTPs, 5 $\mu$ L de DNA e água ultra-pura esterilizada para completar o volume final para 25 $\mu$ L. Também foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento, partindo de 42°C até 50°C a fim de determinar a melhor temperatura para a reação. As reações foram realizadas no termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster, EUA).

### **3.5.6 Avaliação da Sensibilidade**

Para avaliar a sensibilidade analítica das reações, os DNAs obtidos das amostras de referência: *C. chauvoei* (ATCC 10092); *C. septicum* (ATCC 12464); *C. sordellii* (ATCC 9714); *C. novyi* tipo A (ATCC 19402) e *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624), utilizadas como controles positivos foram estimados utilizando o equipamento NanoDrop ND 1000

*Spectrophometer* (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). Após dosagens acima, as amostras foram diluídas de forma seriada na base 10, de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  e submetidas à PCR.

### **3.5.7 Avaliação da Especificidade**

Para avaliar a especificidade foram realizadas PCR com DNA obtido das amostras de referência (obtidos de acordo com o item 3.5.1) de *Clostridium tetani* (ATCC 9441), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27707), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25319), *Escherichia coli* (ATCC 21986), *Clostridium difficile* (ATCC 9689), *Proteus mirabillis* (ATCC 12453) e *Salmonella typhi* (ATCC 9992V).

### **3.5.8 Análise dos Produtos da PCR**

A análise dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Agarose Padrão Agargen, Espanha). Dez microlitros do produto amplificado foi aplicado em gel a 2% (v/v) com 2  $\mu$ L de brometo de etídio (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, foram submetidos a uma corrente elétrica de 90 volts e 200mA, por 150 minutos em tampão TBE 0,5X (1 X TBE = 0.089 M Tris, 0.089 M ácido bórico, 0.002 M EDTA, pH 8.0). As bandas foram visualizadas no transiluminador e analisadas por comparação a um marcador de tamanho molecular (100bp, DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, Brasil).

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

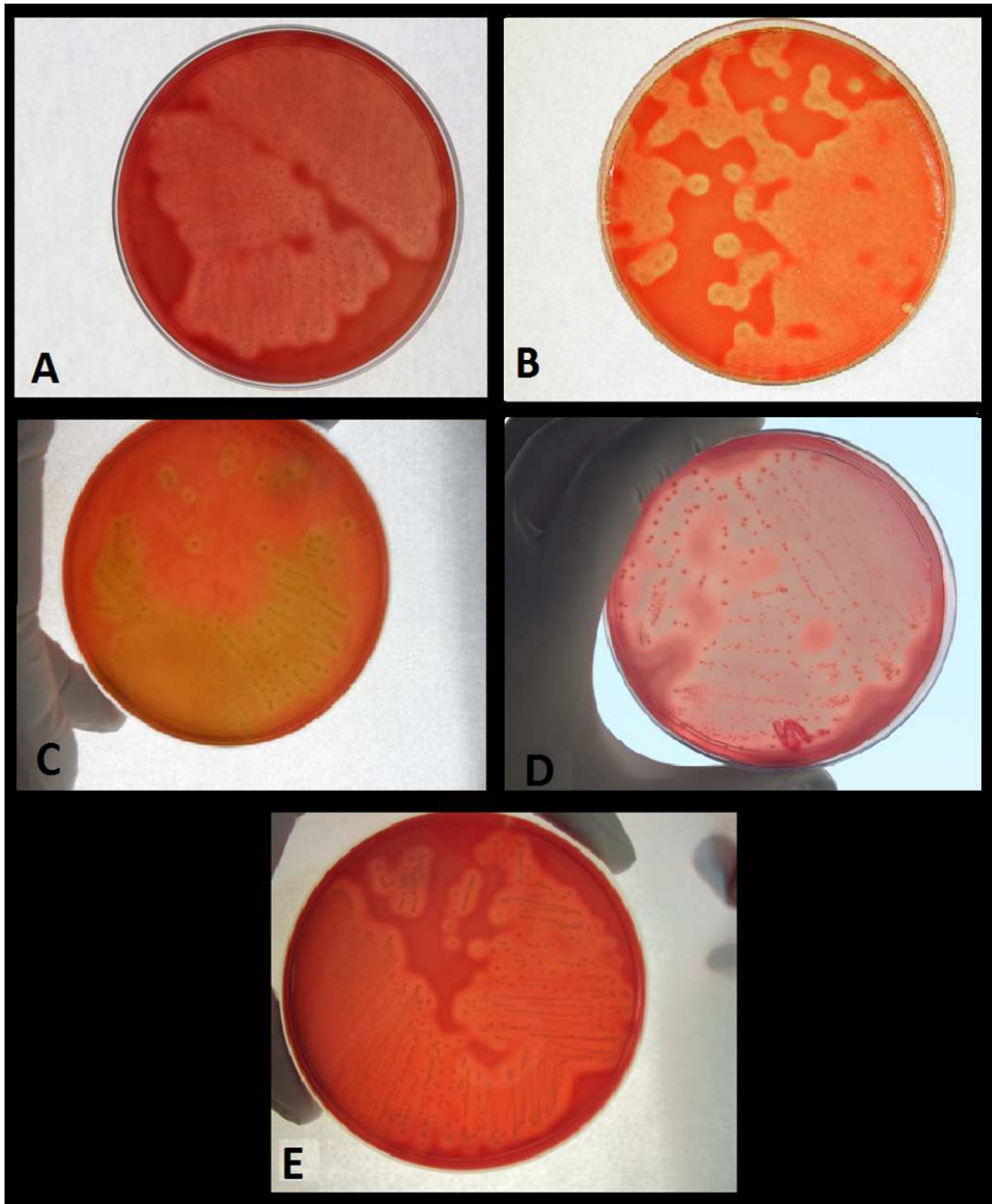
### 4.1 Cultivo, identificação e obtenção de DNA das amostras

As amostras de referência utilizadas como controles positivos: *Clostridium septicum* (ATCC 12464); *Clostridium chauvoei* (ATCC 10092); *Clostridium sordellii* (ATCC 9714); *Clostridium novyi* tipo A (ATCC 19402) e *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 3624); apresentaram-se características, sendo que apenas as placas incubadas em ambiente anaerobiose apresentaram crescimento microbiano.

O crescimento de *C. septicum* em ágar sangue apresentou colônias com bordas irregulares, aspecto úmido, acinzentadas, dispersas e com zona de hemólise (Fig. 2A), de acordo com o descrito por Quinn (2005) e Kennedy *et al.*, (2009). As colônias de *C. chauvoei*

apresentaram bordos irregulares, ligeiramente acinzentadas e uma zona de hemólise bem marcada (Fig. 2B), conforme descrito por Hatheway (1990) e Quinn (2005).

Em relação a *C. sordellii* (Fig.2C) observaram-se colônias com aspecto regulares, lisas, ligeiramente arredondadas, esbranquiçadas (ficam transparentes com o decorrer do tempo) e hemolíticas, sendo que devemos ressaltar que existe variabilidade entre estirpes a respeito da presença de hemólise (Quinn,2005; Adalpe *et al.*, 2006). Já as colônias de *Clostridium novyi* tipo A foram redondas, lisas, esbranquiçadas e com as zonas de hemólise variáveis fato atribuído ao tipo de toxina produzida (Hatheway, 1990; Quinn *et. al.*, 2005). *C. perfringens* apresentou rápido crescimento, colônias umbilicadas com aspecto úmido, levemente acinzentadas e com zona dupla de hemólise (Fig. 2E) (Hatheway, 1990; Quinn *et. al.*, 2005).



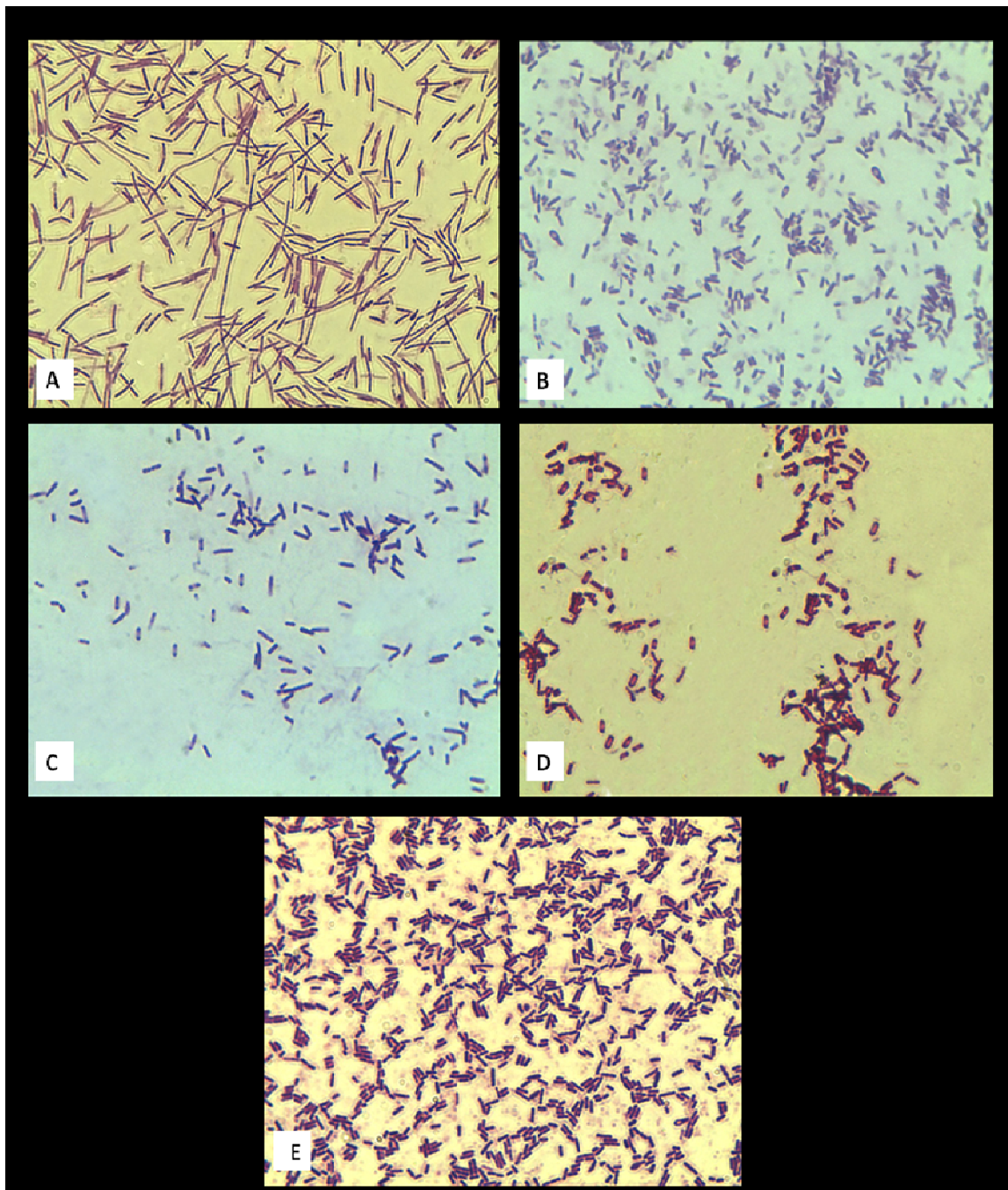
**Fig.- 1** Placas de petri com ágar sangue e que apresentaram crescimento microbiano após inoculação e incubação em ambiente de anaerobiose. **2A** *Clostridium septicum*. **2B** *Clostridium chauvoei*. **2C** *Clostridium sordellii*. **2D** *Clostridium novyi* tipo A. **2E** *Clostridium perfringens* tipo A

Após a análise da morfologia das colônias, foram feitos esfregaços, corados pela técnica de Gram e visualizados ao microscópio. Neste trabalho, essa ferramenta foi utilizada para avaliar o estado de conservação da amostra, observando tanto a ausência de outras espécies bacterianas, bem como a apresentação de características típicas das espécies estudadas. Critérios adotados para essa avaliação foram: uniformidade na morfologia dos bastonetes, presença ou não de esporos seus tipos presentes (Sebald & Petit, 1997).

A morfologia dos espécimes-alvo observados sob a coloração de Gram neste trabalho está de acordo com o descrito na literatura (Hatheway, 1990; Sebald & Petit, 1997; Quinn, 2005; Kennedy *et al.*, 2009).

A lâmina com esfregaço de colônia de *C. septicum* apresentou bastonetes gram positivos, alongados e em sua maioria alinhados em

cadeias (Fig.3A). Os bastonetes gram positivos com endósporos em forma de limão presentes e característicos de *C. chauvoei* foram visualizados na lâmina com esfregaço de colônia correspondente (Fig. 3B). A lâmina com esfregaço de colônia de *C. sordellii* apresentou bastonetes gram positivos com a intensa presença endósporos que não causam deformidade a célula-mãe (Fig. 3C). A lâmina de *C. novyi* tipo A apresentou bastonetes gram positivos, curtos, com uma leve deformidade em cada célula mãe que apresentou endósporos (Fig. 3D); A última lâmina documentada, apresentou bastonetes gram positivos curtos, sem presença de esporos, pois *C. perfringens* dificilmente esporula *in vitro* (Fig. 3E).



**Fig.- 2** Esfregaços das colônias obtidas nas placas de ágar sangue e submetidas a coloração de Gram. **3A** *Clostridium septicum*. **3B** *Clostridium chauvoei*. **3C** *Clostridium sordellii*. **3D** *Clostridium novyi* tipo A. **3E** *Clostridium perfringens* tipo A

## 4.2 Padronização das PCRs

### 4.2.1 PCR

A primeira parte desse processo foi definir os iniciadores a serem utilizados em cada PCR. A partir de uma revisão na literatura, observou-se que alguns sistemas de marcação usados inicialmente, como 16S e 23S não são tão eficientes para essa função porque os membros desse gênero apresentam grande similaridade genética (alcançando até 99,3% entre *C. septicum* e *C. chauvoei*) (Kunhert *et al.* 1997), assim tentamos privilegiar uma marcação gênica mais específica, tendo como alvos genes de flagelina, e genes constitutivos (Kojima *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2002; Dhalluin *et al.*, 2003).

Os primeiros iniciadores definidos foram obtidos no artigo de Sasaki *et al.* (2002) para a identificação de *C. septicum*, *C. novyi* tipo A e *C. chauvoei*, com a marcação do gene da flagelina. Como esses iniciadores provêm de um artigo que apresenta uma PCR *Multiplex* para o estudo do gene da flagelina, foi necessário padronizar uma PCR para cada um dos agentes. Porém nesse processo, a PCR para o *C. chauvoei* apresentou diversos problemas julgou-se necessário buscar novos iniciadores para essa espécie.

Posteriormente, para identificação do *Clostridium chauvoei* foram testados alguns iniciadores (Sasaki *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2001, Sasaki *et al.*, 2002; Uzal *et al.*, 2003), e o que se mostrou mais eficiente, sendo escolhido, foi o do trabalho de Sasaki *et al.* (2001) que, apesar de este ser baseado no sistema 16S-23S,

os autores, ao desenharem estes iniciadores, escolheram o gene *rrnA*, que marca a diferença entre as espécies.

Buscando características que favorecessem a elaboração da PCR *Multiplex*, foi definido que os próximos iniciadores deveriam ter amplificações não muito extensas, temperatura de anelamento médio (48-52°. C) semelhante aos já escolhidos (Henegariu *et al.*, 1997). Como não foram encontrados na literatura, iniciadores com essas características específicas, foram desenhados dois pares de iniciadores para atender as necessidades deste trabalho.

Os desenhos dos iniciadores para identificar *C. sordellii* e *C. perfringens* tipo A foram feitos no programa *Primer 3* (Rozen e Skaletsky, 2000), que está disponível online, com ajustes apenas para o tamanho do produto amplificado e para a temperatura de anelamento média, e as outras especificações de acordo com o recomendado pelo programa.

Para fazer os desenhos, foram utilizadas sequências gênicas disponibilizadas pelo GenBank ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)). Foram privilegiadas sequências parciais ou totais de genes constitutivos, pois são os melhores sistemas para diferenciar espécies do gênero *Clostridium sp.* (Kojima *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2002; Dhalluin *et al.*, 2003).

A cada tentativa, o produto amplificado foi verificado com a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Tool* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que é um sistema que verifica banco de sequências

gênicas disponibilizadas para comparação com o segmento amplificado. Esse processo é extremamente importante para analisar a qualidade dos iniciadores, pois assim ao obter o grau de similaridade do amplificado com outras espécies e a especificidade dos mesmos. Para o desenho dos iniciadores para identificar *C. sordellii* foram testadas algumas sequências, porém a escolhida foi a presente no registro GenBank: AY700154.1 que foi resultado de um estudo do gene *tpi* no gênero *Clostridium sp.* Na comparação com *BLAST* teve uma similaridade de cerca de 80% apenas com o *C. difficile* apesar de ser grande essa porcentagem, *C. difficile* não causa mionecrose e dificilmente é implicado como um invasor de carcaça. O desenho dos iniciadores que indentificariam *C. perfringens* tipo A, a sequência escolhida foi GenBank AF477009, resultado de um estudo a respeito de toxinas dessa espécie e o produto amplificado não apresentou similaridades significativas com outras espécies do seu gênero.

Após essa etapa foi necessário estabelecer cinco protocolos de PCR, pois além de ser pré-requisito para se estabelecer um protocolo *Multiplex*, como o descrito por Henegariu (1997) os iniciadores escolhidos na literatura foram provenientes de outros protocolos, com ampliações múltiplas simultâneas e os outros, que foram desenhados especialmente para esse trabalho, que não tinham protocolo estabelecido. As PCR foram padronizadas com o DNA obtido das amostras de referência citadas e não apresentaram ampliações no controle negativo.

Após os testes com gradientes de reagentes e de temperatura, as PCR foram padronizadas. Todos os testes durante essa etapa foram feitos buscando uma uniformidade nesses resultados para facilitar a padronização da PCR *Multiplex*. A tabela abaixo apresenta as concentrações ideais de cada um dos reagentes avaliados.

Tabela 4 – Concentrações ideais dos reagentes utilizados em cada *Monoplex* para a amplificação dos genes: *tpi* (*Clostridium sordellii*), *cpA* (*Clostridium perfringens*), *16S-23S* (*Clostridium chauvoei*), *fliC* (*Clostridium septicum*) e *fliC* (*Clostridium novyi* tipo A)

Agentes	Reagentes				
	Tampão da Reação	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	Taq DNA polimerase	Iniciadores
<i>Clostridium septicum</i>	1X	1,5mM	0,2mM	1U	0,5µM
<i>Clostridium chauvoei</i>	1X	1,5mM	0,2mM	1U	1,0µM
<i>Clostridium novyi</i> tipo A	1X	1,5mM	0,2mM	1U	0,5µM
<i>Clostridium sordellii</i>	1X	1,5mM	0,2mM	1U	0,5µM
<i>Clostridium perfringens</i>	1X	1,5mM	0,2mM	1U	0,5µM

Os iniciadores específicos para *C. chauvoei* necessitaram de uma concentração maior em comparação com os outros para atingir um

melhor equilíbrio de reação. Além disso, é possível observar uma uniformidade na concentração dos reagentes necessários em cada

uma das reações de PCR *Monoplex*. Isto se deve as características dos iniciadores escolhidos: temperaturas de anelamento médio semelhantes; certa proximidade do tamanho molecular dos produtos que amplificam; teores de guanidina-citosina aproximados. Estas características fazem com que as necessidades dos reagentes sejam próximas e facilitam o processo de padronização da PCR *Multiplex*, como previamente descrito por Henegariu *et. al* (1997).

A tabela abaixo apresenta as temperaturas ideais definidas para cada etapa das reações de PCR encontradas por meio de gradientes de temperatura. Quanto ao tempo necessário, optou-se começar cinco minutos de desnaturação inicial e 30 segundos em cada uma das etapas. Os tempos foram ajustados de acordo com o surgimento das necessidades e pela eficiência da *taq* polimerase utilizada.

Tabela 5 – Temperaturas ideais em cada etapa das reações de PCR para a amplificação parcial dos genes *tpi* (*Clostridium sordellii*), *cpA* (*Clostridium perfringens*), *fliC* (*Clostridium chauvoei*), *fliC* (*Clostridium septicum*) e *fliC* (*Clostridium novyi* tipo A)

Agentes	Início Desnaturação	Ciclo			Fim Extensão
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>Clostridium septicum</i>	95°C por 5 min	95°C por 30s	53°C por 30s	72°C por 30s	72°C por 8 min
<i>Clostridium sordellii</i>					
<i>Clostridium novyi</i> tipo A			48°C por 30s	72°C por 120s	
<i>Clostridium chauvoei</i>					
<i>Clostridium perfringens</i>					

\*Foram definidas 35 repetições do ciclo para as reações

O tempo definido nas etapas dos ciclos da PCR para identificação de *C. chauvoei* foi aumentado para 60 segundos no anelamento e 120 segundos na extensão devido principalmente ao tamanho do produto a ser amplificado (522 pb).

As temperaturas da etapa de anelamento definidas neste experimento apresentaram valores próximos (48-53°C), devido à escolha dos iniciadores, o que conseqüentemente também facilitou o processo para padronizar a reação de PCR *Multiplex* porque a capacidade

de ligação dos iniciadores permanece ativa em faixas de temperatura semelhantes.

Os DNAs obtidos das amostras de referência: *C. chauvoei* (ATCC 10092); *C. septicum* (ATCC 12464); *C. sordellii* (ATCC 9714); *C. novyi* tipo A (ATCC 19402) e *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624) tiveram suas concentrações estimadas em valores de 9,0 ng a 20,0 ng, sendo 15,0 ng a média encontrada. A amplificação esperada foi obtida até a diluição  $10^{-3}$  do molde de DNA, resultando em um limite de detecção

de até 0,015 mg da amostra. Com a técnica padronizada não houve ampliações no teste de especificidade, confirmando a especificidade da reação.

Ao compararmos a PCR que identifica *Clostridium chauvoei* feita por Kojima *et al.* (2001) e a de Sasaki *et al.* (2001) com a feita neste trabalho, pode-se notar principalmente a grande diferença de volume no protocolo. A PCR deste trabalho mostrou-se economicamente mais viável em função de necessitar de uma menor quantidade de reagentes.

Os iniciadores provenientes do trabalho de Sasaki *et al.* (2002), utilizados para o desenvolvimento desta PCR *Multiplex* para o diagnóstico de mionecroses clostridiais, integram uma PCR *Multiplex* para o estudo do gene da flagelina dos clostrídios. Por se tratar de um protocolo *Multiplex* os reagentes envolvidos estão em maiores concentrações do que nas PCRs *Monoplex* feitas neste trabalho, o que dificulta uma comparação com os protocolos de PCR *Monoplex*.

Estas reações, isoladamente, não são muito úteis no diagnóstico definitivo das mionecroses clostridiais, pois o ideal é que sejam feitas reações para cada espécie possivelmente envolvida, o que demanda mais tempo e reagentes. Neste caso, a elaboração de uma PCR *Multiplex* se torna mais prática e, por sua vez, mais economicamente viável para a confirmação da(s) espécie(s) envolvida(s) (Markoulatos *et al.*, 2002; Deustch e Mathur, 2011).

#### **4.2.2 PCR *Multiplex***

Na elaboração do protocolo de PCR *Multiplex* os ajustes foram feitos por meio de gradientes de temperatura de anelamento e de gradientes de concentrações de iniciadores. As temperaturas de anelamento e as concentrações dos iniciadores foram testadas com gradientes até obter-se as condições ideais para a reação. A tabela abaixo apresenta as concentrações definidas como ideais para a reação.

Tabela 6 – Concentrações ideais dos reagentes utilizados na PCR *Multiplex* para amplificação parcial e simultânea de genes constitutivos dos clostrídios histotóxicos

Identificação	Iniciadores		dNTP	Tampão Especial	<i>Taq</i> Polimerase
	Espécie	Concentração			
FlaF	<i>C. septicum</i> e <i>C. novyi</i> tipo A	1,0µM			
FlaseR	<i>C. septicum</i>	0,5µM			
FlanaR	<i>C. novyi</i> tipo A				
Sas_01F	<i>C. chauvoei</i>	1,0µM	0,2mM	1x	3,5U
Sas_01R					
PF	<i>C. perfringens</i> tipo A	0,5µM			
PR					
SR	<i>C. sordellii</i>	0,5µM			
SF					

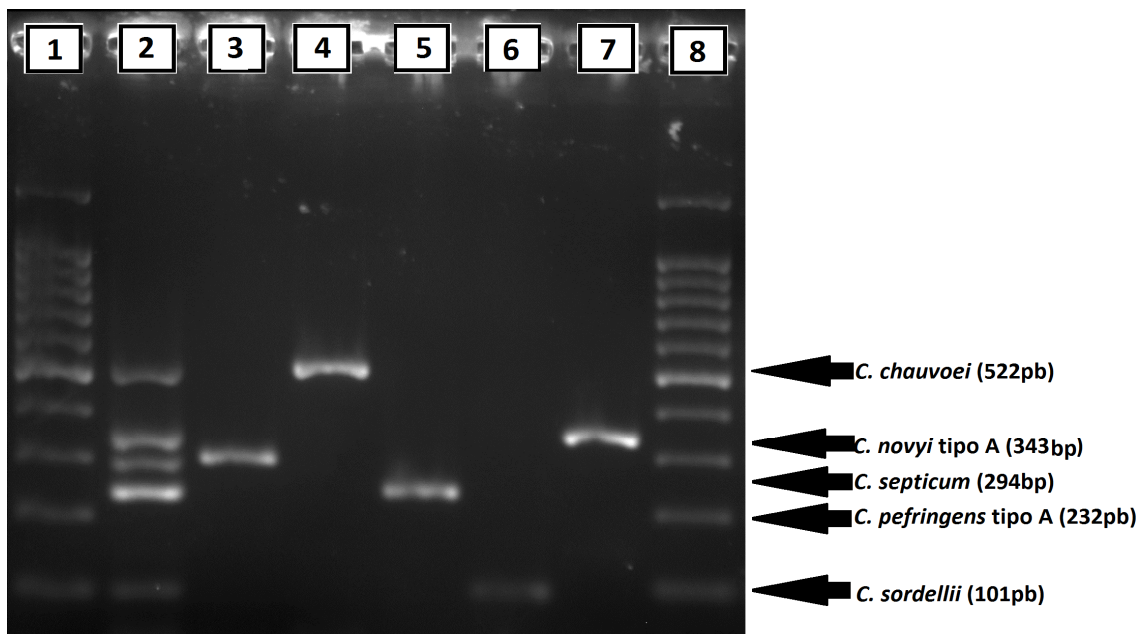
Com relação aos iniciadores, todos foram padronizados a 0,5 µM, enquanto os iniciadores FlaF, Sas01F e Sas01\_R que identificam *C. chauvoei* foram padronizados em concentrações um pouco maiores (1µM) com o intuito de se equilibrar a reação. O iniciador senso, FlaF, participou na obtenção de dois produtos, o amplificado de *C. septicum* e *C. novyi* tipo A. Enquanto Sas\_01F e Sas\_01R que identificam *C. chauvoei* tiveram este aumento para equilibrar a reação.

A principal dificuldade encontrada foi o ajuste das amplificações que estavam apresentando bandas com baixa intensidade no gel. Isto foi contornado por meio do uso do tampão Especial IVB (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) que tem uma liberação diferenciada de íons de magnésio e seu uso foi suficiente para ajustar a reação.

As temperaturas das etapas da reação foram definidas: 94° C na desnaturação inicial por

quatro minutos, desnaturação 94 °C, anelamento 48° C, extensão 72° C, sendo que estas três etapas têm um minuto de duração cada e devem ser repetidas 40 vezes, e extensão final de 72 °C por oito minutos. Essa definição da temperatura de anelamento, o menor valor da sua coluna na Tabela 5, se mostrou ideal, pois nessa temperatura a sensibilidade dos iniciadores na solução onde ocorre a PCR é favorecida, facilitando que acoplem na fita de DNA molde.

A figura 4 apresenta uma fotodocumentação da PCR *Multiplex* deste trabalho. Observar que na canaleta 2 temos bandas resultantes da amplificação simultânea de *Clostridium perfringens* tipo A (236bp), *Clostridium septicum* (294bp) e *Clostridium novyi* tipo A (343bp) *Clostridium sordellii* (101bp) . Os resultados obtidos com a PCR *Multiplex* mantêm identidade com as reações *Monoplex* confirmando a padronização da técnica.



**Fig. 3** – Eletroforese em gel de agarose da PCR *Multiplex* com material genético de referência para identificação de genes constitutivos de clostrídios histotóxicos. Legenda: Canaleta 1: 100bp; Canaleta 2: bandas resultantes da amplificação simultânea para identificação dos cinco clostrídios histotóxicos; Canaleta 3: banda resultante da amplificação parcial do gene *fliC* identificando *C. septicum*; Canaleta 4: banda resultante da amplificação parcial do gene *rrnA* identificando *C. chauvoei*; Canaleta 5: banda resultante da amplificação parcial do gene *cpA* identificando *C. perfringens* tipo A; Canaleta 6: banda resultante da amplificação parcial do gene *tpi* identificando *C. sordellii*; Canaleta 7: banda resultante da amplificação parcial do gene *fliC* identificando *C. novyi* tipo A; Canaleta 8: 100bp

Na avaliação de sensibilidade foi possível observar bandas específicas até a diluição de  $10^{-3}$ , exceto para o amplificado que identifica *C. chauvoei*, nesse caso foi possível observar

bandas específicas até a diluição de  $10^{-2}$ . Isso resulta em uma detecção de aproximadamente 0,15 ng para *C. chauvoei* e 0,015 ng para os outros



**Fig. 4** – Eletroforese em gel de agarose com material genético obtido das amostras de referência utilizadas para teste de especificidade. Canaletas 1 e 18.(100bp) Canaletas 2-17: Controle Negativo e testes em duplicata.

Não aconteceram amplificações no teste de especificidade (fig 5).

A PCR *Multiplex* desenvolvida neste trabalho é a primeira que contempla os cinco agentes das mionecroses clostridiais. Até o presente momento, as PCRs desenvolvidas com foco em diagnóstico etiológico não abrangiam estes agentes provavelmente devido a um direcionamento previamente fornecido pela

literatura, na qual *C. septicum* e *C. chauvoei* são os principais agentes (Useh *et al.*, 2006; Sathish & Swaminathan, 2008; Assis *et al* 2010).

Porém, como foi apresentado na revisão de literatura, trabalhos recentes, como Pires (2011) demonstram a necessidade de estudos sobre a frequência destes agentes, pois existem sinais de que a realidade é pode ser distinta do que literatura indica. Bem como outros indicativos sobre a importância como os dados apresentados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (15338 casos de mionecroses clostridais apenas no estado de Minas Gerais, no período de 1990-2011) demonstrando a necessidade de estudos sobre a incidência e levantamentos sobre os reais prejuízos causados aos rebanhos. Assim, esta PCR *Multiplex* integra um novo quadro de ferramentas rápidas e eficientes disponibilizadas para o diagnóstico etiológico que auxiliariam essas pesquisas futuras.

Esta PCR *Multiplex* agora é parte da rotina de diagnóstico de mionecroses clostridiais do Laboratório de Bacteriologia de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e foi empregada com sucesso em três casos clínicos, de suspeita de mionecrose causada por clostrídios histotóxicos, os dois primeiros em novilhas e o terceiro em um cão, que gerou o artigo a ser publicado (ANEXO 1).

Comparando este trabalho com anteriores, como os de Kunhert *et al.* (1996), Takeuiche *et al.* (1997) analisaram e forneceram grandes

informações para o estudo filogenético das estirpes do gênero *Clostridium* causadoras de mionecrose. Porém, o foco de tais trabalhos não era o diagnóstico, permanecendo ainda a necessidade de padronização de técnicas moleculares para detecção rápida de tais agentes.

Até este período existia uma grande dificuldade de separar estirpes de *C. chauvoei* da espécie *C. septicum*. Então, nos anos de 2000 e 2001, Sasaki e colaboradores realizaram estudos a respeito da semelhança gênica entre as espécies *C. chauvoei* e *C. septicum* (99,3%) que no gene *rrnA* 16-23S-rDNA poderia ser feita uma distinção e teve-se uma aplicação para diagnóstico etiológico em isolados. Neste trabalho, os iniciadores usados por Sasaki *et al.* (2001) foram os que apresentaram melhor funcionalidade em conjunto com os demais empregados para a padronização da PCR *Duplex* apresentando resultados superiores aos outros iniciadores testados.

Os pesquisadores Kojima *et al.* (2001) e Sasaki *et al.* (2002) expandiram os conhecimentos filogenéticos estudando novas maneiras de identificar geneticamente os clostrídios, como o gene da flagelina. Porém, essas reações também foram padronizadas com um grande volume (100µL), utilizam métodos de extração complexos, como a extração por fenol-clorofórmio-alcool que fornece um DNA purificado, porém demanda tempo; enquanto a extração térmica adaptada a partir do trabalho de Baums *et al.* (2004), fornece DNA em menos de meia hora.

Devido as infecções mionecrosantes clostridiais e a necessidade de diagnóstico, Uzal *et al.* (2003) buscaram identificar *Clostridium chauvoei*, que é considerado o clostrídio histotóxico mais importante, em material clínico. Obtiveram excelentes resultados com essa PCR em isolados clínicos e em tecidos parafinizados. Porém, essa PCR contempla apenas um agente, e conforme foi discutido, as mionecroses clostridiais podem ter o envolvimento de até cinco espécies.

Ao compararmos esse trabalho com a PCR *duplex* de Assis *et al.* (2008) observa-se que para *C. chauvoei* o limite de detecção obtido em 2008 foi de 0,045 ng em comparação com 0,15 ng no presente trabalho, enquanto para os outros agentes o limite de detecção do presente trabalho foi de 0,015 ng e para *C. septicum* foi de 0,03ng (Assis *et al.* 2008). Essas diferenças podem ser creditadas a uma série de fatores: diferentes iniciadores, diferente número de produtos amplificados. Em um laboratório de rotina diagnóstica, a PCR deste trabalho oferece vantagens sobre os outros protocolos já estabelecidos por poder detectar simultaneamente um ou mais agentes causadores de mionecroses clostridiais.

Na PCR em tempo real relatada por Lange *et al.* (2010), obteve-se 0,001 ng/ $\mu$ L de sensibilidade analítica; e na de Garafolo *et al.* (2011), 0,0001ng por reação. Devido à natureza dessa variante da PCR, ela consegue atingir esse apurado nível de sensibilidade. Porém, para executar esse tipo de técnica são necessárias sondas fluorescentes e equipamento

especializado, os quais não são tão acessíveis quanto um termociclador comum e uma cuba de eletroforese.

A continuidade desse trabalho será a padronização desta técnica a partir de DNA extraído direto de tecidos frescos e parafinizados, para estudos retrospectivos e determinação etiológica de clostrídios histotóxicos.

## 5. CONCLUSÃO

O protocolo de PCR *Multiplex* estabelecido nesse trabalho demonstrou-se eficiente para a identificação etiológica dos agentes causadores das mionecroses, e pode substituir com sucesso a identificação bioquímica na rotina laboratorial

## REFERÊNCIAS

- ADAK, G.K.; LONG, S.M.; O'BRIEN, S.J. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*. v.6, p.832-841, 2002.
- AGRAWAL, N.; BETTEGOWDA, C.; CHEONG, I.; *et al.* Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v 101, 15172-15177, 2004
- ARAÚJO, R.F.; CURCI, V.C.L.M.; NOBREGA, F.L.C.; FERREIRA, R.M.M.; DUTRA, I.S.; Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. *Pes. Veter. Bras.*, v30, n.7, p.554-558, 2010.
- ALDAPE, M.J.; BRYANT, A.E.; STEVENS, D.L.; *Clostridium sordellii* Infection: Epidemiology, Clinical Findings and Current Perspectives on Diagnosis and Treatment. *Clin. Infect. Dis*, v. 43, 1436-46p. 2006

- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; DIAS, L.D. et al. Produção y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Revi. Med. Vet.*, v.82, n.2, p.68-70, 2001.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F; MARTINS, N.E. et al.; An outbreak of malignant edema in cattle. *R. Port. de Ciên. Vet.*, v. 97, 143-145p. 2002
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F; SERAKIDES, R.; et al. Clostridial myonecrosis in sheep after caseous lymphadenitis vaccination, *Vet. Rec.*, n.154; 380, 2004
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.C; SERAKIDES, R.; SANTOS, R.L.; et al. Immunohistochemical detection of Clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs; *Pes. Veter. Bras.*, v.1, n.25; 4-8p. 2005
- ASSIS, R.A; LOBATO, F.C.F; CARVALHO, A.U; et al. Surto de Carbúnculo Sintomático em Bezerros.: *Ciên. Rur.*, v.35, n.4, p.945-947, 2005.<sup>a</sup>
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MIYAKAWA, M.F.; Reação da Cadeia de Polimerase para identificação de *C. chauvoei* em tecidos de *Cavia porcellus*. *Pesq. Agropec. Bras.* v.40, n. 12, p. 1247-1250, 2005<sup>b</sup>
- ASSIS, R.A. *Mionecroses: Estudos Epidemiológicos e Moleculares*. 2005. 70p. [Tese] Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; LOBATO, Z.I.P.; et al.; PCR Multiplex para a identificação de isolados de *C. chauvoei* e *C. septicum*; *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.* v.60, n. 2, p.294-298, 2008
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MABONI, F.; et al Mionecroses Clostridiais Bovinas, *Comunicação Científica, Arq. Inst. Bio.*, v.77, n.2, p.331-334, 2010
- ARMSTRONG, H.L.; MacNAMEE, J.K.; Blackleg in Deer, *J. Amer. Vet. Ass.* v. 117, 212-214p. 1950
- AUB, J.C.; ZAMECNICK, P.C.; NATHANSON, I.T. Physiological action of *Clostridium oedematiens* (novyi) toxin in dogs. *J. Clin. Inve.* v.26, n.3, 404-410p.; 1946
- AWAD, M.M.; BRYANT, A.E.; STEVENS, D.L. Virulence studies on chromosomal  $\alpha$  toxin e  $\theta$  toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of  $\alpha$ -toxin in *Clostridium perfringens* mediated Gas Gangrene. *Mol. Micro.*, v.15, 191-202p. 1995
- BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D. et al Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*, *Inf. Im.*, n.60, 784-790p. 1992
- BALL, D.W.; VAN TASSELL, R.L.; ROBERTS, M.D. et al. Purification and characterization of alpha toxin produced by *Clostridium novyi* type A. *Inf. and Imm.*, v.61, n.7, p. 2912-18, 1993.
- BANGSBERG, D.R.; ROSEN, J.I.; ARAGON, T.; Clostridial myonecrosis cluster among drug injection users: a molecular epidemiology investigation. *Arch. Inter. Med.*, v.162, p.517-522, 2002
- BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G. et al. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotype of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol*, v.100, p.11-16, 2004.
- BARBIER, J.; POPOFF, M.R.; MOLGO, J.; Degeneration and Regeneration of murine skeletal neuromuscular junctions with a sublethal dose of *Clostridium sordellii* lethal toxin, *Infec. Immun.* v.72, p.3120-3128, 2004

- BARNES, D.M.; BERGERLAND, M.E.; HIGBEE, J.M.; Selected blackleg outbreaks and their relation to soil excavation. *Canad. Vet. J.*, v.16, n.9, p.257-259. 1975
- BENSON, D.A.; KARSCHI-MIZIRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W.; GenBank. *Nuc. Aci. Res.*, v. 39, p. D32-D37, 2011
- BRASIL, *Plano agrícola e pecuário 2011/2012*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, 2011
- BRYANT, A.E.; STEVENS, D.L.; Clostridial Myonecrosis: New Insights in Pathogenesis and Management, *Cu. Infe. Dis. Rep.*, v. 12, p.383-391, 2011
- BROOKS, M.E.; EPPS, H.G.B.; Taxonomic studies of the Genus *Clostridium*: *Clostridium bifermentans* e *Clostridium sordellii*. *J. of Gen. Micro.*, n.21, 144-155p. 1958
- BURGART, L.; ROBINSON, R.; HELLER, M. *et al* Multiplex Polimerase Chain Reaction. *Mod. Pat.* v.5, p.320-323, 1992.
- BUXTON, D.; DONACHIE, W.C.; Clostridial Disease. In: *Disease of Sheep*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 2<sup>a</sup>. Ed. 1991 p.104-114
- CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. *Essentials of veterinary bacteriology and micology*. 4.ed. London: Lea & Febiger, 1991. 283p.
- CHOI, Y.K.; KANG, M.S.; YOO, H.S. *et al* *Clostridium perfringens* type a myonecrosis ia a horse in Korea, *J. Vet. Med. Sci.*, n.65, v.11, p.1245-1247, 2003
- COSTA, J.L.N.; OLIVEIRA, M.M.D.; LOBATO F.C.F. Outbreak of gas gangrene in sheep by *Clostridium sordellii* after routine clostridial vaccination. *Vet. Rec.* v. 160, p. 594-595, 2007
- CDC, Centers for Disease Control and Prevetion: Soft tissue infection among injection drug users: San Francisco, California, 1996-2000 *MMWR, Mor. Mort. We. Re.* n.50 p.381-384, 2000
- CHANKRACHANG,S.; ARAYAWICHANON T, A.; POUNGVARIN, N. *et al* Prophylactic botulinum type A toxin complex (Dysport®) for migraine without aura, *Head.*, v. 51, n.1, 52-63p. 2011
- DHALLUIN, A.; LEMÉE, L.; PASTEL-CARON, M.; Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of *triosephosphate isomerase (tpi)* gene. *System. Appl. Microbiol.* v. 26, 90-96p. 2003
- DANG, L.H.; BETTEGOWDA, C.; HUSO, D.L. *et al*. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Pro. of the Nat. Acad. Scie U S A*, v. 98, n. 26, p. 15155-60, 2001.
- DAVIES, A.H.; ROBERTS, A.K.; SHONE, C.C.; Super toxins from a superbug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins, *Bioch. J.l*, v.436, p.517-526, 2011
- DE LA FE, C.; RODRIGUEZ, J.M.; RAMIREZ, G.A.; HERVÁS, J.; GIL, J.; POVEDA, J.B.; Sudden death associated with *Clostridium sordellii* in captive lions (*Panthera leo*). *Vet. Patho.*, v.43, n.3, p.370-374, 2006
- DEUTSH, U.; MATHUR, D.; Streamling PCR Multiplex Analisis; *Gen. Eng. & Biotec. N.* ; v. 31, n. 21, 2011
- DIAZ, L.A.J.R.; CHEONG, I.; FOSS, C.A. *et al*. Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores. *Tox. Scie.*, v.88, n. 2, p. 562-575, 2005
- DYLEWSKI, J.; DRUMMOND, R.; ROWEN, J. A case of *Clostridium septicum* spontaneous

- gas gangrene. *Canadi. J. of Emer. Med.*, v. 9, n. 2, p. 133-5, 2007.
- EUZÉBY, J.P.; List of prokaryotic names standing in nomenclature, LPSN, *Clostridium spp.*; [On-Line] Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>> Acesso em: 12 Jan 2012
- FERREIRA, J.L.M.; LADEIRA, S.R.L.; RUAS, J.L. *et al.*; *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico* Pelotas. Gráfica Universitária, UFPEL, 2008 72p.
- GAMBOA, M.M.; RODRIGUEZ, E.; VARGAS, P.; Diversity of mesophilic clostridia em Costa Rican soils. *Anaerobe.*, n.11, 322-326, 2005
- GARAFOLO, G.; GALANTE, D.; SERECCHIA, L. *et al.* Development of a real time PCR taqman assay based on the TPI gene for simultaneous identification of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*, *J. of Micro. Met.*, n.84, p.307-311, 2011
- GARCÊS, S. P. S.; LIMA, A.O. S. Desenho e Validação *in silico* de Primers Intragenéricos. In: Workshop de Tecn. da Inf. Aplicada ao Meio Ambiente – *CBComp*, 2004 Anais.
- GENY, B.; KHUN, H.; FITTING, C.; ZARANTONELLI, L. *et al* *Clostridium sordellii* lethal toxins kills mice by inducing a major increase in lung vascular permeability, *Ame. Jour. of Pat.*, v.70, 1003-1007p. 2007
- GENTH, H.; JUST, I.; Functional implications of lethal toxin-catalysed glucosylation of (H/K/N)Ras and Rac 1 in *Clostridium sordellii* associated disease. *Eur. J. Cell. Biol.*; p. 50517-50524, 2010
- GYLES, C.L. *Pathogenesis* of bacterial infections in animals. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. *Histotoxic clostridia*. 2ed. Ames : Iowa University, 1993. p.106-113.
- GUANXING, L.; HYUN, S.L.; KYUNG, W.L. *et al* An outbreak of gangrenous dermatitis in commercial broiler chickens, *Avi. Pat.*, v.39, n.4, p.247-253, 2010
- GOODMAN, C.; Gas Gangrene, *Anal. Surg.*; n. 79, v. 6, 806-812, jun. 1924
- GORDON, V.M.; BENZ, R.; FUJII, K. *et al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Inf. and Im.*, 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. *Jour. Bio. Chem.* v.274, n.38, p. 27274-80, 1999.
- GUTTENBERG, G.; PAPTODOROU, P.; GENISYUERK, S. *et al* Inositol Hexakisphosphate-dependent Processing of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin and *Clostridium novyi*  $\alpha$ -Toxin, *The J. of Bio. Chem.*, v. 286, n 17; 14779-14786 p. 2011
- HALM, A.; WAGNER, M.; KOFER, J.; HEIN, J.; Novel Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in Clostridial Myonecrosis, *Journ. Cli. Microbio.*, v.48, n.4, p.1093-1098, 2010
- HANG'OMBE, B.M.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M. *et al.* Purification and sensitivity of *Clostridium chauvoei* hemolysin to various erythrocytes. *Comp. Imm. Microbio. and Infect. Dis.*, v. 29, n.4, p. 263-68, 2006
- HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R. *et al.* Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Bio. Tech.*, v.23, p.504-511, 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 Patho.*, v. 4, n. 4, p.1-9, 2008.
- JANK, T.; AKTORIES, K.; Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the

- ABCD Model. *Trends. in Microbio.*, v.16, n.5, p.222-229, 2008
- JANVILISRI, T.; SCARIA, J.; GLEED, R.; *et al.* Development of a microarray for identification of pathogenic clostridia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 66, n.2; 140-153p. 2010
- KENNEDY, C.L.; LYRAS, D.; CORDNER, L.M. *et al* Pore-forming activity of alpha toxin is essential for *Clostridium septicum* mediated myonecrosis. *Inf. and Im.*, v. 77, n.3, p. 943-951, 2009
- KENNEDY, C.L.; SMITH, J.D.; LYRAS, D. *et al* Programmed Cellular necrosis mediated by pore-forming alpha toxin from *Clostridium septicum*; *PLoS Path.*, v. 5, n. 7, 1-10p. 2009
- KERRY, J.B.; A note on the occurrence of *Clostridium chauvoei* in the spleens and livers of normal cattle. *Vet. Rec.* v. 76, 396p; 1964
- KIKUCHI, E.; MIYAMOTO, Y.; NARUSHIMA, S.; Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts, *Microbio. and Immun.*; v.46, n.5, p.353-8, 2002
- KIMURA, A.C.; HIGA, J.L.; LEVIN, R.M.; Outbreak of necrotizing fasciitis due to *Clostridium sordellii* among black-tar heroin users. *Cli. Infec. Disea.*, v.38, p.87-91; 2004
- KNAPP, O.; MAIER, E.; MKADDEN, SB.; *Clostridium septicum* alpha-toxin form pores and induces rapid cell necrosis. *Toxicon*, v.55, p.61-72, 2010
- KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKISAKI, T. *et al.* Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Vet. Microbio.* v.78, n.4, p.363-371, 2001.
- KUHNERT, P.; CAPAUL, S.E.; NICOLET, J.; Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. of Sys. Bact.* v.46, n.4, p.1174-1176, 1996.
- KUHNERT, P.; KRAMPE, M.; CAPAUL, S.E. *et al* Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Vet. Microbio.*, v.51, p.291-298, 1997
- KULLMAN, F. A comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. *Acta Biot.*, v. 18, n. 1, p. 77-83, 1998.
- LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.*, v. 25, n. 4, p. 409-18, 2001
- LEWIS, C.J.; Control of Important Clostridial Disease of Sheep; *Vet. Clin. Food. Anim.* n. 27, 121-126p.; 2011
- LIMA, C.G.R.D.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. *et al* Surto de gangrena gasosa em rebanho de ovinos e caprinos. *Cie. Vet. nos Tróp.*, v.9, p.106-109, 2006.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses, *Hora. Vet.*, v.19, p.29-33, 2000
- LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; PIRES, P.S.; *et al* Surto de Gangrena Gasosa em Ruminantes; *Anais Congresso In: Anais. Conbravet* 2008
- 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. *Vaccinia.*, v. 28, n. 38, p. 6125-7, 2010.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M.; Multiplex Polymerase Chain

- Reaction: a Pratical Approach. *J. of Cli. Lab. Anas*, v. 16, p.47-51, 2002
- MALETZKI, C.; GOCK, M.; KLIER, U. *et al.* Bacteriolytic therapy of experimental pancreatic carcinoma, *Wor. Journ. Gastroente.* v.16, n.28, 3564-3552p. 2011
- MARTINEZ, R.D.; WILKINS, T.D.; Comparison of *Clostridium sordellii* toxins HT and TL with toxins A and B of *Clostridium difficile*, *J. Med. Micro.* v.36, p.30-36, 1992
- MCNEE, J.W.; DUNS, J.S.; The method of spread of gas gangrene into living muscle. *Brit. Med. Jour.*, v. I; 727-729, 1917
- MENDEZ-ÁLVAREZ, S.; PÉREZ-ROTH, E.; La PCR Multiple em microbiologia clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; v. 22, n.3, 183-92p. 2004
- MOHAMED, O.E.; TAGELDIN, M.H.; EL-SANNOUSI, S.M.; Some observations on the pathogenecity of blackleg disease. *Bull. Ani. Heal. Prod. in Africa*, v. 38, 355-357, 1990
- MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *Jour. Path. and bacte.*, v. 77, n.2, p. 341-50, 1959.
- NAGAHAMA, M.; UMEZAKI, M.; ODA, M.; *et al.*; *Clostridium perfringens* iota toxin b induces rapid cell necrosis.; *Infect. and Immu.* v. 79, n. 11, p.4353-4360, 2011
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype, *Trends in Microbiology*, n.7, 1004-110p. 1999
- PINTO, F.F.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; VARGAS, A.C.; BARROS, R.R.; GONÇALVES, L.A.; Edema maligno em suínos. *Ciência Rural*, v.35, n.1, p.227-229, 2005
- PIRES, P.S. Estudo Patológico, Padronização e uso da Imuno-Histoquímica em Animais Experimentalmente e Naturalmente Infectados com Clostrídios Histotóxicos. 2011, 46p. Dissertação Mestrado em Ciência Animal. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011
- POPOFF, M.R.; BOUVET, P. Clostridial Toxins; Review, *Future Microbiology* v 4, n 8, 1021-1064p. 2009
- RADOSTITS, O.M; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; *Clinica Veterinária – Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*, 9. Ed, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002.
- RAHMAN, H.; CHAKRABORTY, A.; RAHMAN, T. *et al* Clostridial myonecrosis clinically resembling black quarter in an Indian elephant (*Elephas maximus*) *Rev. Sci. Tech. Off int. Epiz.*, v.28, n.3, p.1069-1075, 2009
- RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T. *et al.* Suggest guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Jour. Vet. Diagn. Investi.*, v. 20, p. 393-413, 2008.
- ROCHE, *PCR Applications Manual*. Germany. Roche Diagnostic 2006. Disponível em: <[http://www.roche-applied-science.com/publications/print\\_mat/pcr\\_application\\_manual\\_3rd\\_edition.pdf](http://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/pcr_application_manual_3rd_edition.pdf)> Acesso em 20.Dez.2011
- ROZEN, S., SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Metho. Mol. Biol.* v 132, p. 365-86. 2000
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; AMIMOTO, K. *et al* Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Research in Veterinary Science*, v.71, n.3, p.227-9, 2000
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KOJIMA, A. *et al* Rapid identification and differentiation of

- pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Res. in Vet. Scie.*, v. 69, n.3, p. 289-94, 2001.
- SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H. *et al* Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene, *Vet Microbiol.* v.86 n.3, p.257-67, 2002.
- 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.
- SATISH, S.; SWAMINATHAN, K.; Genetic diversity among toxigenic clostridia isolated from soil, water, meat and polluted sites in south India. *Ind. Jour. Med. Microbio.*, v.27, n.4, 311-320p. 2009
- SCHIRMER, J.; AKTORIES, K.; Large Clostridial Citotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochi. et Biophy. Acta*, v 1673, 66-74p. 2004
- SEBALD, M.; PETIT, J.C. *Identification des Clostridium species. Méthodes de laboratoire bactéries anaérobies et leur identification.* 2.ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. 300p.
- SELZER, J.; HOFFMAN, F.; REX., G.; WILM, M.; MANN, M.; JUST, I.; AKTORIES, K.; *Clostridium novyi* alpha toxin catalyzed incorporation of GlcNac into Rho subfamily proteins, *Jour. of Bio. Chem.*, v. 271, n.41, p. 25173-25177, 1996
- SENGUPTA, N.; ALAM, S. I.; In vivo studies of *Clostridium perfringens* in Mouse Gas Gangrene Model. *Cur. Microbio.*, v. 62, p. 999-1008, 2011
- SEPP, S.; SZABÓ, I.; UDA, H.; SAKAMOTO, H.; Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. of Cli. Path.* v.47, p.318. 1994
- SIMONATO, L.E.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M. Avaliação de Dois Métodos de Extração de DNA de material parafinado para amplificação em reação de PCR. *J. Bras. Pato. Méd. Lab.*, v.43, n.2, p.121-127, 2007
- SOJKA, J.E.; BOWERSOCK, T.L.; PARKER, J.E. *et al.* *Clostridium chauvoei* myositis in a neonatal calf. *J Vet Diagn Invest* n.4, p.201-203, 1992
- SONGER, J.G. Clostridial diseases of small ruminants. *Vet. Res.*, v.29, p.219-232, 1998.
- SMITH, L.D.S.; *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, Illinois: Thomas, Springfield. 3<sup>a</sup>. Ed. 550p. 1984
- STERN, M.; BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. Londres: Butlerworth&CO, 1975 144p.
- STEVENS, D.L.; TWETEN, R.K.; AWAD, M.M.; *et al.*: Clostridial gas gangrene: Evidence that alpha and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J Infect Dis* v.176 p.189-195, 1997
- TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T. *et al* Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction, *J. Vet. Med. Scie.*, v.59, n.9, p.853-855, 1997
- TELLEZ, G.; PUMFORD, N.R.; MORGAN, M.J. Evidence for *Clostridium septicum* as a primary cause of cellulitis in commercial turkeys. *J. Vet. Diag. Inves.* v.21 n.3, p. 374-377, 2009
- TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUN, P.E. *et al* *Genus Clostridium – Clostridia in Medical Veterinary and Food Microbiology.* European Concerted Action, 2006, 214p.
- UZAL, F.A.; PARAMIDANI, N.; ASSIS, R. *et al* Outbreak of clostridial myocarditis in calves, *Vet. Rec.* v.152, n.5, p.134-136, 2003
- UZAL, F.A.; HUGENHOLTZ, P.;

- BLACKALL, L.L. *et al* PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Vet. Microbio.*, v.91, n2-3., p.239-48, 2003
- UZAL, F.A. Evidence Based Medicine Concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. *Vet. Clin. Food. Anim.* v. 28, 71-77p., 2012
- URBINA, P.; COLLADO, M.I.; ALONSO, A. *et al* Unexpected wide substrate specificity of *C. perfringens* alpha toxin phospholipase C, *Bioch. Biophi. Acta*, n.1880, p. 2618-2627, 2011
- USEH, N.M.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N; Blackleg in ruminants; *CAB Rev. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, n. 1. 1-8p. 2006
- USEH, N.M.; NOK, A.J.; ESLEVO, K.A.; Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuroaminidase. A short review. *Veterinary Quarterly*, n.25, p.155-159, 2003
- VERPOORT, J.A.; JOUBERT, F.J.; JASEN, B.C. Studies on the soluble antigen and haemolysin of *Clostridium chauvoei* strains. *Afr. J. Agric. Scie.*, v. 9, p.153-72, 1966.
- VIERA, A.S.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARINI, F.M. *et al.* Genotipagem de *C. perfringens* isolados de leitões diarréicos; *Comunicação Científica, Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.4, p.513-516, 2008
- VIERA, A.S.S.; Padronização e aplicação da PCR Multiplex na tipificação de isolados de suínos diarréicos. Mestrado em Ciência Animal. Dissertação. Escola de Veterinária – UFMG, 2006
- VILEI, E.M.; JOHANSSON, A.; SCHALATTER, Y. *et al* Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*, *Veterinary Research*, [On-Line]. Disponível em: <<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/2>> Acesso em 02 Out. 2011
- WEESE, J.S.; Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy and zoonotic potential; *Vet. Clin. North Amer. Small Ani. Prat.* v. 41; n. 2; 287-309p. 2011
- WHITE, T. J.; MADEJ, R.; PERSING, D. H. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, v.29, p.161-96, 1992.
- ZANE, S.; GUARNER, J.; Gynecologic Clostridial Toxic Shock in Women of Reproductive Age, *Curr Infect Dis Rep.*; n. 13; 561-570p. 2011

## ANEXO I

### **Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new Multiplex-PCR method**

#### **ABSTRACT**

Clostridial myositis is an acute, generally fatal toxemia that is considered to be rare in pet animals. The present report describes an unusual canine clostridial myositis that was diagnosed by a new multiplex-PCR (mPCR) designed for simultaneous identification of *Clostridium sordellii*, *C. septicum*, *C. perfringens* type A, *C. chauvoei*, and *C. novyi* type A. A ten-month-old male Rottweiler dog, that had

displayed lameness and swelling of the left limb for 12 hours, was admitted to a veterinary hospital. The animal was weak, dyspneic and hyperthermic, and a clinical examination indicated the presence of gas and edema in the limb. Despite emergency treatment, the animal died in only a few minutes. Samples of muscular tissue from the necrotic area were aseptically collected and plated onto defibrinated sheep blood agar (5%) in anaerobic conditions. Colonies suggestive of *Clostridium* spp. were submitted to testing by multiplex-PCR. Impression smears of the tissues, visualized with Gram and also with panoptic stains, revealed long rod-shaped organisms, and specimens also tested positive using the fluorescent antibody technique (FAT). The FAT and mPCR tests enabled a diagnosis of *Clostridium septicum* myonecrosis in the dog.

**Key words:** *Clostridium septicum*; gas gangrene; canine

## INTRODUCTION

Clostridia are Gram-positive, anaerobic, rod bacteria that are a significant cause of disease and death in humans and animals. *Clostridium septicum*, *C. perfringens* type A, *C. chauvoei*, *C. sordellii* and *C. novyi* type A, alone or combined, are responsible for malignant edema and gas gangrene. Clostridial myositis is often recognized as an acute, generally fatal toxemia in cattle (Assis et al., 2010), horses (Peek et al., 2003), sheep and goats (Lima et al., 2006), and pigs (Pinto et al., 2005), but it is considered to be rare in companion animals (Greene, 2006).

There are several descriptions of clostridial myonecrosis in dogs, but unfortunately, most of these reports provide only clinical and *post-mortem* information, with poor etiological identification (Thomson and Eger, 1997). When etiological procedures have been performed, they have been based on phenotypic methods using isolation, biochemical and morphological characteristics (Dow et al., 1986; Mané et al., 1992), which are considered to be laborious and time consuming, require trained personnel, and may provide inaccurate results (Assis et al., 2010). This paper describes an unusual myositis by *C. septicum* in a dog that was diagnosed by a new Multiplex-PCR for simultaneous identification of *C. septicum*, *Clostridium sordellii*, *C. perfringens* type A, *C. chauvoei*, and *C. novyi* type A.

## CASE REPORT

A ten-month-old male Rottweiler dog was admitted to the veterinary hospital of the School of Veterinary Medicine and Animal Science – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, presenting with marked lameness and swelling of the left hindlimb. According to the pet owner, these clinical signs began during the night, approximately 12 hours before the animal's arrival at the hospital. Clinical examination revealed a cutaneous abscess in the left foreleg and several rounded lesions on the abdominal and limb

areas, which are symptoms compatible with myiasis. The animal was weak, dyspneic and hyperthermic. The left limb was massively swollen and tense, displaying severe cracking and soreness upon palpation, which indicated the presence of gas and edema. Manipulation of the limb was extremely painful, but no other injuries were apparent. A blood sample for a complete blood count (CBC) was taken, and the dog received aggressive fluid therapy, crystalline penicillin (40,000 IU/kg, IV) and metronidazole (15 mg/kg, IV). In addition, the animal was given a dose of benzathine penicillin (40,000 IU/kg, IM). Despite this emergency treatment, the animal died a few minutes later during the radiological exam.

A necropsy was performed immediately after the dog's death. Samples of muscular tissue from the necrotic area were aseptically collected and plated onto defibrinated sheep blood agar (5%) in both anaerobic and aerobic conditions, and MacConkey agar in aerobic conditions (Difco Laboratories, USA). After incubation in anaerobic conditions at 37°C for 48-72 hours, we observed swarming, spreading, hemolytic colonies. Gram staining of these colonies revealed Gram-positive organisms with characteristic rod shapes. No other pathogenic microorganisms were isolated on blood agar or MacConkey agar in aerobic conditions. The plates with colonies suggestive of the genus *Clostridium* were refrigerated and submitted to the Veterinary School of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, for molecular analysis using the multiplex-PCR technique.

Simultaneously, impression smears of limb secretions and muscle and liver fragments were visualized by Gram and panoptic stains and used for fluorescent antibody technique (FAT) as previously described (Assis et al., 2001), using conjugate antibodies for *C. septicum*. A *Clostridium sordellii* reference strain from the American Type Culture Collection (ATCC 12464) was used as a positive control.

For all PCR reactions, the DNA extraction was performed according to the method of Baums et al. (2004), and samples were stored at 4°C until use. The multiplex-PCR reactions were performed with 5 µl of DNA added to a mixture containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 200 µM of each dNTP, 3.5 U of *Taq* Polymerase (Phorontia®, Belo Horizonte, Brazil) and the 10 primers, shown with relevant concentrations in Table 1. The final reaction volume was 25 µl. The *C. septicum* and *C. novyi* type A primers have been previously described by Sasaki et al. (2002). The *C. chauvoei*-specific primers have been previously described by Kojima et al. (2001). The primers used for detection of *C. perfringens* and *C. sordellii* were deduced from analysis of housekeeping genes in each species.

**Table 1 – Primers used in multiplex-PCR for identification of *Clostridium sordellii*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, and *C. novyi* type A in diagnosis of canine myonecrosis by *C. septicum*. Brazil, 2011.**

The amplification cycles consisted of a denaturation step of 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 1 min at 95°C for denaturation, 1 min at 48°C for annealing and 1 min at 72°C for extension. A final extension cycle of 10 min at 72°C was also performed. The positive control was a DNA mixture of the following reference strains, from the American Type Culture Collection (ATCC): *Clostridium chauvoei* (ATCC 10092), *Clostridium septicum* (ATCC 12464), *Clostridium sordellii* (ATCC 9714), *Clostridium novyi* type A (ATCC 19402), and *Clostridium perfringens* type A (ATCC 3624). The PCR assay amplifications were performed in a thermocycler (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster, USA), and the products were visualized under UV light in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

The CBC revealed a severe anemia with evidence of hemolysis and a reduction of hematocrit (27%) and hemoglobin (8.5 g/dL) associated with an increase in packed cell volume ( $79.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), although alterations to the platelet count were not observed. The white cell blood count was below normal levels ( $1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ). The radiological exams revealed a diffuse and pale swelling and extensive gas infiltration of the thoracic bilateral and lumbar soft tissue. The abdominal cavity displayed a moderate amount of liquid that caused organ dislocations. The necropsy results revealed muscle fibers separated from one another by the presence of gas. Muscles were emphysematous, displaying a dark red color and some gray areas, which is indicative of necrosis (**Figure 1**). The carcass was diffusely congested, and there was moderate to intense bloodstained edema in the subcutaneous tissue, with gas bubbles present over large areas of the medial side, extending into inguinal, abdominal and thoracic areas. Extra-muscular injuries, such as suffusions on the heart muscle and severe local mucohemorrhagic enteritis, were also observed. The panoptic and Gram stains of affected muscles showed, respectively, organisms with long rod filaments and chains of Gram-positive microorganisms, suggestive of *C. septicum* (Quinn et al., 1994). The FAT and PCR-multiplex performed on muscle tissue and from isolated colonies, respectively, were both positive only for *C. septicum* (**Figure 2**).

In the dog we examined, the initial source of infection was not obvious, much like other previously reported cases of canine clostridiosis (Denny, Minter and Osborne, 1974, Poonacha et al., 1989). The absence of another wound suggests that myiasis could be the initial cause of this infection. The clinical signs reported – particularly the marked lameness, severe cracking, and soreness – may be considered characteristic of inflammatory myopathy and agree with other, similar reports in dogs (Denny, Minter and Osborne, 1974, Poonacha et al., 1989, Mané et al., 1992, Thomson and Eger, 1997). In addition, the short time interval between the appearance of clinical symptoms and the death of the dogs are also common in clostridial myonecrosis (Denny, Minter and Osborne, 1974, Poonacha et al., 1989, Greene, 2006), although in some dogs, this interval can be as long as six days (Stead and Lawson, 1981). Regardless of the affected animal species, clostridial myonecrosis can progress rapidly and

become severe within a few hours, commonly resulting in the death of the infected host (Pinto et al., 2005, Lima et al., 2006, Bryant and Stevens, 2010).

Alpha toxin, recognized as the main virulence factor of *C. septicum*, causes intravascular hemolysis. Despite the scarcity of published information about clostridial myonecrosis in dogs, Ponnacha et al. (1986) also reported canine myonecrosis by *C. septicum*. Their animal showed an increase in alkaline phosphatase and aspartate transaminase that could be associated with the hepatic necrosis secondary to severe hypoxia-caused centrilobular hemolytic anemia, similar to that observed in our dog. There are limited data regarding hematological changes in canine clostridial myonecrosis (Greene, 2006). In work similar to our present report, Thomson and Eger (1997) also found anemia in a dog with clostridiosis, but the moderate presentation was attributed to blood loss into a fracture, the primary site of infection. Mane et al. (1992) described a case of canine clostridial myositis without blood parameter alterations. Unfortunately, these comparisons are of limited use because most previous studies did not identify the clostridia species involved. Nevertheless, clostridial myositis may not necessarily be associated with clinical and hematological signs of toxemia (Thomson and Eger, 1997).

The occurrence of clostridial myositis is considered to be rare, judging by the paucity of recorded cases (Greene, 2006), which only sporadically appear in the literature of the last 30 years (Poonacha et al., 1989, Mane et al., 1992, Thomson and Eger, 1997). Canine clostridiosis have most commonly been associated with the management of long bone fractures (Denny et al., 1974, Cooper et al., 1976, Happé et al., 1981, Stead and Lawson, 1981). *C. perfringens* appears to be responsible for the majority of these cases (Denny et al., 1974, Down et al., 1986).

Another case of canine myositis involving infection by *C. septicum* was described elsewhere, and the responsible clostridia species was determined by FAT using impression smears from muscle lesions (Poonacha et al., 1989). Similar to previously described findings by Poonacha et al. (1989), lesions in our current case were compatible with muscle emphysema, a diagnosis based on the radiological exam results and the necropsy. Evidence supports the hypothesis that *C. septicum* proliferate and produce gases that move along tissue planes, resulting in muscle emphysema. *C. septicum* can also cause tissue necrosis, edema, ischemia, fever and intestinal hemorrhage (Van Vleet & Valentine, 2007). All of these manifestations were observed in the specimen we examined and are intimately related to the effects of alpha toxin, the main virulence factor of *C. septicum* (Hickey et al., 2008; Kennedy et al., 2009).

Despite having received treatment, our animal rapidly died. This fact highlights the need for a quick diagnosis, clinical approach and emergency treatment in cases of canine clostridial myonecrosis. Moreover, it is important to note that anaerobic infections are able to persist in necrotic tissues and resist antimicrobial agents. In addition to high-dose and long-term antibiotic therapy, debridement,

aggressive fluid therapy and drainage are recommended as support therapies in canine clostridiosis (Thomson and Eger, 1997, Greene, 2006).

The clinical, microbiological, cytological and molecular findings described here enabled our diagnosis of malignant edema in a dog, ultimately caused by *C. septicum*. The fluorescent antibody test (FAT) on direct smears is a specific technique that is recognized as an effective method for a definitive diagnosis of clostridia infection (Assis et al., 2001). The FAT is the gold-standard method used worldwide for animal clostridiosis. It is a rapid and safe test, although it has the disadvantages of requiring fresh material, a specialized microscope, and labeled primary antibodies that are difficult to obtain commercially (Assis et al., 2001).

Molecular analysis, performed by PCR, confirmed that there was no association with other clostridia in our case. The present report of canine myonecrosis by *C. septicum* was diagnosed using a multiplex-PCR for detection of the most common histotoxic clostridia. This method was sensible, reliable, suitable and quick and could also be very helpful for future clostridial diagnosis in other domestic animals.

## REFERENCES

- 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.; NASCIMENTO, R.A.P. *et al.* Mionecroses clostridiais bovinas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.2, p.331-334, 2010.
- BAUMS, C.G., SCHOTTE, U., AMTSBERG, G. AND GOETHE, R. (2004) Diagnostic multiplex PCR for toxin genotype of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* **100**, 11-16.
- BRYANT, A.E.; STEVENS, D.L. Clostridial myonecrosis: New insights in pathogenesis and management. *Current infectious Dis Rep*, v.12, p. 383-391, 2010.
- COOPER, NA; UNSWORTH, IP, TURNER, DM; ILKIW, JE. Hyperbaric oxygen used in the treatment of gas gangrene in a dog. *Journal of small animal practice*, v.17, p. 759-64, 1976.
- DENNY, HR; MINTER, H; OSBORNE, AD. Gas gangrene in the dog. *Journal of small animal practice*, v.15, p. 523-27, 1974.
- DOW, S.W.; JONES, R.L., ADNEY, M.S. Anaerobic bacterial infections and response to treatment in dogs and cats: 36 cases (1983-1985). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 189, p. 930-934, 1986.
- GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. Sanders Company, Philadelphia. 1387p.

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.

KENNEDY C.L., LYRAS D., CORDNER L.M., *et al.* Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for clostridium septicum-mediated myonecrosis. *Infect and Immun.* 2009;77:943-951.

KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKIZAKI, T.; SASAKI, Y.; OGIKUBO, Y.; TAMURA, Y.; Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Vet Microbiol.*v.78(4), p.363-71, 2001.

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.

MANE, M.C.; VIVES, M.A.; BARRERA, R.; EZQUERRA, L.J.; JIMENEZ, A.; RPDRIGUEZ, J. A putative clostridial myositis in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, v. 33, p. 345-348, 1992.

ODANI, J.S.; BLANCARD, P.C.; ADASKA, J.M. MOELLER, R.B., UZAL, F.A. Malignant edema in postpartum dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 21, p. 920-924, 2009.

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.

PINTO, F.F; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; VARGAS, A.C.; BARROS, R.R.; GONÇALVES, L.A. Edema maligno em suíno. *Ciência Rural*, v. 35, n.1, p. 227-229, 2005.

POONACHA, K.; DONAHUE, H.M.; NIGHTUNGALE, J.R. Clostridial myositis in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*. V. 18. P. 807-811, 1989.

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

SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H.; OGIKUBO, Y.; TAKIKAWA, N.; TAMURA, Y. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene, *Vet Microbiol.* v.86(3), p.257-67, 2002.

STEAD, A.C.; LAWSON, G.H.K. A study of the incidence and significance of *Clostridium welchii* in the wounds of dogs undergoing open reduction of fractures. *Journal of small animal practice*, v.22, p.1-6, 1981.

THONSON, M.J.; EGER, C.E. Management of a femoral fracture complicated by clostridial myositis. *Journal of small animal practice*, v. 38, p. 70-73, 1997.

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

**Table 1** – Primers used in multiplex-PCR for identification of *Clostridium sordellii*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, and *C. novyi* type A.

Species		Sequence (5'- 3')	Primer concentration (µm)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>C. septicum</i>	Forward	AGAATAAACAGAGCTGGAGATG	1.0	294	Sasaki et al. 2002
	Reverse	CTTCACAAACACAATTCAATAAA	0.5		
<i>C. chauvoei</i>	Forward	GAATTA AAAACA ACTTTAACAAATG	1,0	522	Sasaki et al., 2001
	Reverse	GGATCAAGAACTCTAAACCTTTCT	1,0		
<i>C.novyi type A</i>	Forward	AGAATAAACAGAGCTGGAGATG	1.0	343	Sasaki et al. 2002
	Reverse	CGCCTACTTGGAAAGTTACTC	0.5		
<i>C. perfringens</i>	Forward	AATGTTACTGCCGTTGATAG	0.5	236	GenBank: AF477009.1
	Reverse	CAATCATCCCAACTATGACT	0.5		
<i>C. sordellii</i>	Forward	GTAGTGCTTGGACACTCTGA	0.5	101	GenBank: AY700154.1
	Reverse	ATTGGATCTATTCCAGCTTC	0.5		

**Figure 1:** Muscles of the left hindlimb with emphysema and edema. Note the dark red color with some gray areas, indicative of necrosis.



**Figure 2:** Multiplex-PCR for detection of histotoxic *Clostridium* species. First lane, 100 bp DNA Ladder; second lane, DNA mixture of *C. chauvoei* ATCC 10092 (522 bp), *C. septicum* ATCC 12464 (294 bp), *C. sordellii* ATCC 9714 (101 bp), *C. novyi* type A ATCC 19402 (343 bp) and *C. perfringens* type A ATCC 3624 (236 bp); third lane, *C. septicum* strain isolated from dog; fourth lane, negative control; fifth lane, 100 bp DNA Ladder.