

**Luciana Aramuni Gonçalves**

**SELEÇÃO DE COLÔNIAS DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TIPO D  
PRODUTORAS DE TOXINA ÉPSILON POR “DOT BLOT”**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2004**

G635s Gonçalves, Luciana Aramuni, 1977-  
Seleção de colônias de *Clostridium perfringens* tipo D produtoras  
de toxina épsilon por "Dot Blot" / Luciana Aramuni Gonçalves. – 2004.  
31 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato  
Co-orientadora: Zélia Inês Portela Lobato  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. *Clostridium perfringens* – Teses. 2. *Clostridium* – Toxinas – Teses.  
I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Lobato, Zélia Inês Portela.  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
IV. Título.

CDD – 636.089 692





*Dedico esta dissertação acima de tudo a Deus, meu verdadeiro Mestre.  
Aos meus pais por ter chegado até aqui.  
À vovó Lourdes pelo exemplo de vida e por ter se dedicado tanto à nossa família sempre.*

---

*“Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo o que existe em mim bendiga o seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e jamais te esqueças de todos os seus benefícios. É ele que perdoa as tuas faltas, e sara as tuas enfermidades. É ele que salva tua vida da morte, e te coroa de bondade e de misericórdia. É ele que cumula de benefícios a tua vida, e renova a tua juventude como a da águia. O Senhor faz justiça, dá o direito aos oprimidos. Revelou seus caminhos a Moisés, e suas obras aos filhos de Israel. O Senhor é bom e misericordioso, lento para a cólera e cheio de clemência. Ele não está sempre a repreender, nem eterno é o seu ressentimento. Não nos trata segundo os nossos pecados, nem nos castiga em proporção de nossas faltas, porque tanto os céus distam da terra quanto sua misericórdia é grande para os que o temem; tanto o oriente dista do ocidente quanto ele afasta de nós nossos pecados. Como um pai tem piedade de seus filhos, assim o Senhor tem compaixão dos que o temem, porque ele sabe de que é que somos feitos, e não se esquece de que somos pó. Os dias do homem são semelhantes à erva, ele floresce como a flor dos campos. Apenas sopra o vento, já não existe, e nem se conhece mais o seu lugar. É eterna, porém, a misericórdia do Senhor para com os que o temem. E sua justiça se estende aos filhos de seus filhos, sobre os que guardam a sua aliança, e, lembrando, cumprem seus mandamentos. Nos céus estabeleceu o Senhor o seu trono, e o seu império se estende sobre o universo. Bendizei ao Senhor todos os seus anjos, valentes heróis que cumpris suas ordens, sempre dóceis à sua palavra. Bendizei ao Senhor todos os seus exércitos, ministros que executais sua vontade. Bendizei ao Senhor todas as suas obras, em todos os lugares onde ele domina. Bendize, ó minha alma, ao Senhor” Sl.102*



## AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Francisco Lobato pela orientação, dedicação, incentivo, confiança, carinho, amizade e por ter me “adotado” durante todo esse tempo.

À Profª Zélia Lobato pela força, incentivo, dedicação, profissionalismo, pela amizade e por ser um exemplo para nós mulheres.

A Profª Vera Lúcia Viegas de Abreu pelas correções incansáveis, pelo apoio e incentivo.

Ao Nelson pelo apoio sempre constante a qualquer hora.

À Nádia pela convivência, amizade e formatações.

À todo o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na pessoa do querido amigo Prof. Nivaldo da Silva, em especial ao Jorge, Renata, Creuzinha, Júnia, Joãozinho, Eduardo, Leandro, Angela e Toninho.

Ao Colegiado de Pós Graduação, em especial à Profª Lygia Passos, pela assistência acadêmica e atenção sempre dispensada nas horas de aperto.

Àos amigos e colegas do Laboratório de Anaeróbios da EV/UFMG: Liliane, Patrícia, Andréa, Theonys, Carlos, Thiago, Michele, e em especial ao Eduardo, Formiga, Augusto, Ronnie e Felipe pelo apoio constante, convívio e amizade.

Às “meninas” do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Ana Cláudia, Ana Paula, Flu, Karina, Kika, Telmex, Renata, pela amizade, convivência e boas risadas; em especial ao Prof. Andrey Pereira Lage, pela amizade e sempre disposição em ajudar.

Ao LARA-PL, em especial ao Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Pedro Motta e Maurício Baltazar, pelo apoio, disponibilidade, doação dos camundongos e do laboratório para desenvolvimento de boa parte das pesquisas.

Ao Dr. Luis Guilherme Heneine, pelo apoio e orientação; e a todos do Laboratório de Imunologia da FUNED.

À sempre amiga Simone Renault por ter me aberto as portas da Escola de Veterinária e pela verdadeira amizade em todos os momentos.

Aos amigos e colegas André, Giovanna, Flávia e Alcina; obrigada pela amizade.

Aos meus pais, Fernando e Fátima que eu tanto amo, pelo incentivo e paciência nas horas mais difíceis, à Mônica, ao Naninho e à Emille pela força constante e por sempre acreditarem em mim.

A toda a minha família, Berna, Mari, Tia Ré, T'Ivan, Vó Olga, e primos, por estarem sempre ao meu lado.

À vovó Lourdes que hoje é um anjinho que continua olhando por nós lá do céu.

À toda a Comunidade Mater Crucis pela amizade e orações constantes.

Ao Flávio, meu amor, pela enorme paciência e confiança. Obrigada!!!





---

## SUMÁRIO

---

	Pág
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. LITERATURA CONSULTADA</b> .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1. Local de realização do experimento</b> .....	16
<b>3.2. Animais utilizados</b> .....	16
<b>3.3. Amostras</b> .....	16
3.3.1. Meios de Cultura .....	16
3.3.2. Reconstituição das amostras e avaliação da pureza .....	16
<b>3.4. Diluição das amostras e obtenção de colônias isoladas</b> .....	16
3.4.1. Seleção das colônias isoladas crescidas nas maiores diluições e inoculação em MPT.....	16
<b>3.5. Padronização do “dot blot” para seleção de colônias isoladas produtoras de toxina épsilon</b> .....	17
3.5.1. Utilização do “dot blot” para seleção de clones produtores de toxina épsilon....	17
<b>3.6. Seleção dos clones e titulação da toxina épsilon</b> .....	17
3.6.1. Titulação em camundongos.....	17
<b>3.7. Determinação do limite de detecção do “dot blot”</b> .....	18
<b>3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	18
3.8.1. Iniciadores.....	18
<b>3.9. Determinação da concentração celular das amostras de <i>C. perfringens</i> tipo D</b> .....	18
3.9.1. Concentração celular das colônias isoladas medida por densidade ótica (DO).....	18
3.9.2. Concentração celular das amostras medida por densidade ótica (DO).....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	30
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1	Toxinas produzidas e doenças causadas por <i>Clostridium perfringens</i> .....	13
Quadro 2	Fatores de virulência associados com elementos genéticos móveis ou fatores genéticos extracromossomais em espécies do gênero <i>Clostridium</i> .....	14

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Resumo da metodologia desenvolvida neste trabalho .....	19
Figura 2	“Dot blot” de 48 colônias isoladas da amostra 1 de <i>C. perfringens</i> tipo D na primeira (A) e na terceira seleção (B) .....	21
Figura 3	“Dot blot” de 48 colônias isoladas da amostra 2 de <i>C. perfringens</i> tipo D na primeira (A) e na terceira seleção (B) .....	23
Figura 4	“Dot blot” de 48 colônias isoladas do clone negativo da amostra 1 de <i>C. perfringens</i> tipo D .....	23
Figura 5	Titulação em camundongos dos clones das amostras de <i>C. perfringens</i> tipo D selecionados pelo “dot blot” .....	24
Figura 6	Sensibilidade do “dot blot” utilizando-se toxina épsilon a partir da concentração de 10 µg/ml (C2 e D2) .....	25
Figura 7	Gel de agarose dos produtos da PCR do clone negativo selecionado no “dot blot” .....	27
Figura 8	Correlação celular das colônias isoladas de <i>C. perfringens</i> tipo D após cultivo em MPT por 8 horas a 37°C, medida pela densidade ótica (DO) a 600nm .....	29
Figura 9	Concentração celular das amostras 1 e 2 de <i>C. perfringens</i> tipo D após cultivo em MPT por 10 horas a 37°C, medida pela densidade ótica (DO) a 600 nm .....	29

---

## RESUMO

Para seleção de amostras de *Clostridium perfringens* tipo D produtoras de toxina épsilon, padronizou-se o teste de “dot blot” com toxina épsilon adsorvida em membrana de nitrocelulose, anti-toxina épsilon, produzida em carneiro e anti-immunoglobulina de carneiro, produzida em coelho, marcada com peroxidase. A reação foi revelada utilizando-se Kit Substrato DAB – 3,3’ – diaminobenzidina, e a leitura foi feita visualmente de acordo com a intensidade de cor obtida em cada poço. Foram selecionados clones produtores de toxina épsilon obtidos de unidades formadoras de colônias e, após três passagens, obteve-se títulos em dose mínima mortal (DMM) determinado em camundongos, 1000 vezes superiores aos obtidos com a amostra original. A presença do gene *etx* que codifica a síntese da toxina épsilon foi verificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e todos os clones foram positivos, mesmo aqueles negativos ao “dot blot”. O teste de “dot blot” mostrou-se eficiente para selecionar colônias toxigênicas de *C. perfringens* tipo D.

Palavras chave: *Clostridium perfringens*, toxina épsilon, “dot blot”, gene *etx*, PCR.

## ABSTRACT

In order to select strains of *Clostridium perfringens* type D producers for epsilon toxin, a dot blot was standardized test using epsilon toxin adsorbed in nitrocellulose membrane, anti-epsilon toxin produced in sheep and anti-immunoglobulin of sheep produced in rabbit conjugated with peroxidase. The reaction was visualized using DAB Substrate Kit 3,3’ – diaminobenzidine and the reading was made according to the intensity of color obtained in each well. Clones producing epsilon toxin were selected by limiting dilution and after three passages, mortal minimum dose (MMD) titres were determined in mice. Selected clones produced epsilon toxin 1000 times more concentrated those the original strain. The presence of the gene *etx* that encodes the synthesis of the epsilon toxin was verified by the polymerase chain reaction, and all clones were positive, including those negative at the dot blot. It was concluded that the dot blot test was efficient for selecting toxigenic colonies of *C. perfringens* type D.

Keywords: *Clostridium perfringens*, epsilon toxin, dot blot, gen *etx*, PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes Gram-positivo, anaeróbios que podem esporular em condições adversas. São encontradas nos mais variados ambientes como solo, pastagens, água doce e salgada, alimentos de origem vegetal e animal e podem ser habitantes normais do trato digestivo dos animais e de seres humanos.

Dentre as espécies de importância veterinária, *Clostridium perfringens* destaca-se como causador de enterotoxemias e mionecroses em bovinos, caprinos e ovinos, determinando consideráveis perdas econômicas aos criadores.

De acordo com a produção de quatro toxinas maiores, *C. perfringens* é classificado em A, B, C, D e E. A toxina alfa é produzida pelos cinco tipos, sendo o principal fator de virulência de *C. perfringens* tipo A e tem atividade hemolítica e necrosante. A toxina beta é produzida por *C. perfringens* tipos B e C e tem atividade letal e necrosante. A toxina iota é produzida por *C. perfringens* tipo E e seu modo de ação não está completamente esclarecido. A toxina épsilon é produzida por *C. perfringens* tipos B e D.

*C. perfringens* tipo B é o agente etiológico da disenteria em cordeiros recém-nascidos, uma enterite com extensiva hemorragia, ulcerações no intestino delgado e de alta letalidade. O tipo B pode também estar associado a enterites hemorrágicas em caprinos, bovinos e eqüinos recém-nascidos.

A enterotoxemia é a principal doença causada por *C. perfringens* tipo D em ovinos, caprinos e bovinos, quando submetidos a fatores que alteram a microbiota intestinal, como mudança brusca de alimentação e estresse pós-desmame, com morte súbita após o início dos sintomas. Em ruminantes, alimentação rica em carboidratos e com baixo teor de fibra bruta, provoca alteração da flora normal,

degeneração e calosidade das vilosidades do rúmen. O excesso de carboidratos no duodeno, especialmente glicose e frutose, estimula o crescimento de *C. perfringens* residente e conseqüentemente a produção de toxinas.

A toxina épsilon tem peso molecular de 34kDa e é secretada como uma prototoxina inativa que é ativada no trato gastrointestinal por clivagem proteolítica de 13 aminoácidos da região N-terminal. A toxina épsilon tem atividade necrosante e letal, provoca aumento da permeabilidade intestinal, edema em vários órgãos, hidropericárdio e lesões renais (Hunter et al., 1992).

O gene da toxina épsilon *etx* de *C. perfringens* tipo D pode ser encontrado extracromossomal em plasmídios de amostras dos tipos B e D. A recente clonagem e caracterização do *etx* propiciou novas informações sobre a estrutura e função da toxina e pode ser a base para a geração de vacinas baseadas em toxinas recombinantes ou toxóides. Estudos recentes demonstraram que os genes que codificam a produção de toxinas têm difusão em elementos genéticos móveis como transposons, plasmídios e bacteriófagos.

O controle das enterotoxemias deve se basear em medidas de manejo e em vacinações sistemáticas dos rebanhos, já que os animais estão em constante contato com os agentes e fatores que podem desencadeá-las.

A eficiência das vacinas clostridiais relaciona-se à natureza dos antígenos sendo essas bacterinas e/ou toxóides. As vacinas comerciais existentes são compostas por múltiplos antígenos e são utilizadas como estratégia frente à uma variedade de agentes e toxinas que podem participar das enfermidades. A produção de vacinas múltiplas é um grande desafio tecnológico para a indústria uma vez que se torna necessário colocar um número maior de antígenos num mesmo volume de dose, mantendo-se a mesma eficiência (Mozzer, 2004).

A produção de toxinas por Clostridia é um dos aspectos mais importantes a ser considerado na linha de produção de toxóides eficientes. As amostras sementes utilizadas, a composição dos meios de cultura, pH, tempo, temperatura, e atmosfera de incubação são fatores importantes e devem ser rigorosamente controlados para uma efetiva produção de vacina (Lobato et al., 2000). Segundo Mozzer (2004), o Brasil possui uma capacitação tecnológica limitada na área de cultivo industrial de microrganismos anaeróbios patogênicos.

O objetivo deste trabalho foi selecionar clones de *Clostridium perfringens* tipo D e avaliá-los quanto à produção da toxina épsilon *in vitro* após passagens sucessivas, utilizando-se a técnica de “dot blot”. Os objetivos específicos foram: desenvolver e

padronizar a técnica de “dot blot” para detecção da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D; verificar a relação existente entre a presença da região gênica que codifica a produção de toxina e a síntese da toxina, através da técnica da PCR; analisar quantitativamente a produção de toxina épsilon pelos clones, a cada passagem, utilizando-se o teste “dot blot” comparado à titulação em camundongos.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

Enterotoxemias têm sido relatadas como sendo uma das mais importantes causas de doenças entéricas em animais domésticos. Os clostrídios patogênicos são usualmente identificados baseando-se nas características das toxinas produzidas conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Toxinas produzidas e doenças causadas por *Clostridium perfringens*

Tipo	Toxinas maiores	Doenças em animais domésticos
A	$\alpha$	Mionecroses, enterite necrótica em aves, enterotoxemia em ovinos e bovinos, enterocolite necrótica suína, colite equina, gastrenterite hemorrágica canina.
B	$\alpha, \beta, \epsilon$	Disenteria, enterite crônica em cordeiros, enterotoxemia hemorrágica em ovinos, enterite hemorrágica em eqüinos e bovinos.
C	$\alpha, \beta$	Enterite necrótica em aves, enterotoxemia necrótica ou hemorrágica neonatal (ovinos, suínos, bovinos, caprinos, eqüinos), enterotoxemia ovina.
D	$\alpha, \epsilon$	Enterotoxemia (cordeiros e bezerros), enterocolite caprina e enterotoxemia bovina.
E	$\alpha, \iota$	Enterotoxemia bovina e ovina, enterite em coelhos.

Fonte: Adaptado de Songer, 1997.

A multiplicação de *C. perfringens* tipos B e D leva à produção da toxina épsilon e sua absorção pelo intestino causa toxemia com leve enterite, efusões peritoneal e pericardial são típicas. A toxina épsilon afeta o sistema nervoso central e outros tecidos resultando em morte súbita, alguns animais apresentam opistótono e convulsões antes da morte. Hiperglicemia e glicosúria são detectadas e o rim polposo, nome comum da doença, derivado da autólise pós-morte comumente encontrada e que ocorre

rapidamente nos tecidos renais lesados pela toxina (Songer, 1997).

Dentre as clostridioses, as enterotoxemias são as que mais chamam a atenção de produtores e veterinários. Nas enterotoxemias dos caprinos e ovinos, além da pesquisa de toxinas nos fluidos intestinais, alguns achados podem dar suporte ao diagnóstico definitivo da enfermidade. Em caprinos, a enterotoxemia é principalmente caracterizada pela

ocorrência de enterocolites. Nos ovinos, a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D produz alterações nas células endoteliais do cérebro que levam ao aumento da permeabilidade vascular, produzindo edema cerebral. A alteração histológica mais precocemente observada como consequência a esse processo, é o edema proteináceo perivascular. Quando os animais sobrevivem por períodos superiores a 24 horas, pode-se observar malácia que, em casos severos, pode ser observada macroscopicamente, caracterizando encefalomalácia simétrica focal (Uzal e Kelly, 1998). Um fator de grande discussão no campo, diz respeito ao diagnóstico da enterotoxemia bovina. Pelo fato de *C. perfringens* ser um comensal do trato intestinal, apenas o isolamento do microrganismo não é suficiente para o diagnóstico. Estudos têm sido publicados tentando correlacionar a presença, no conteúdo intestinal, de *C. perfringens*, carreando diferentes genes codificadores de toxinas, com a doença.

O critério mais aceito para estabelecer um diagnóstico definitivo de enterotoxemia é a detecção da toxina no conteúdo intestinal (Uzal et al., 1997). O diagnóstico definitivo da infecção em animais domésticos requer

avaliação de sinais clínicos, achados de necropsia, cultura bacteriana, detecção da toxina no conteúdo intestinal e no sobrenadante de culturas. A detecção da toxina por métodos *in vivo* como a neutralização em camundongos é amplamente utilizada e métodos alternativos como citotoxicidade baseada na susceptibilidade de linhagens celulares Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) (Payne e Oyston, 1997) e imunodiagnósticos como ELISA, têm sido amplamente utilizados como alternativa para a substituição da utilização de animais de laboratórios (El Idrissi e Ward, 1992; Uzal e Kelly, 1998; Parreiras e Lobato, 2001). Nagahama et al. (1991) padronizaram um ELISA para rápida detecção de toxinas de *C. perfringens* e comprovaram a alta sensibilidade do teste capaz de detectar pouco mais de 1,0  $\eta$ g/ml de toxina beta purificada e 0,1  $\eta$ g/ml de toxina épsilon purificada.

Alguns genes que codificam para as várias toxinas clostridiais estão localizados em bacteriófagos lisogênicos não integrativos ou em plasmídios. Outros estão inseridos no cromossomo ou são localizados em bacteriófagos lisogênicos que residem extracromossomalmente no citoplasma conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Fatores de virulência associados com elementos genéticos móveis ou fatores genéticos extracromossomais em espécies do gênero *Clostridium*.

Espécies de <i>Clostridium</i>	Fatores de Virulência	Elementos genéticos extracromossomais
<i>C. perfringens</i>	CPE	Grande plasmídio
<i>C. perfringens</i>	toxina épsilon	Plasmídio
<i>C. perfringens</i>	toxina lambda	Plasmídio
<i>C. botulinum</i> tipos C e D	toxina C <sub>3</sub>	Fago lisogênico não-integrativo
<i>C. botulinum</i> tipos C e D	BoNT/C e BoNT/D	Fago lisogênico não-integrativo
<i>C. botulinum</i> tipos C e D	HÁ/C, D	Fago lisogênico não-integrativo
<i>C. botulinum</i> tipo G ( <i>C. argentinense</i> )	BoNT/G	Plasmídio
<i>C. botulinum</i> tipo G ( <i>C. argentinense</i> )	HÁ/NTNH	Plasmídio
<i>C. butyricum</i>	BoNT/E	Fago lisogênico e/ou plasmídio
<i>C. tetani</i>	TeNT	Grande plasmídio
<i>C. novyi</i>	toxina alfa	Fago lisogênico

CPE: Enterotoxina de *C. perfringens*; BoNT: neurotoxina botulínica; HÁ: hemaglutinina; NTNH, não hemaglutinina não tóxica; TeNT, neurotoxina tetânica. FONTE: Adaptado de Johnson, 1997.

A presença de genes para fatores de virulência em elementos extracromossomais resultam em propriedades fenotípicas como instabilidade genética e capacidade da toxigenicidade ser dispersada por transferência gênica horizontal para organismos não toxigênicos (Bentancor et al., 1999a).

O gene *etx* codifica o maior fator de virulência de *C. perfringens* tipo D, a toxina épsilon, residente num grande plasmídeo que difere de tamanho em amostras diferentes (Petit et al., 1999) o *etx* é ligado a um elemento de inserção conhecido como IS1151. Esse elemento de 1696 pares de bases foi identificado a 96 pares de bases anteriores ao gene *etx* em amostras de *C. perfringens* tipos B e D isoladas. O IS1151 foi caracterizado por conter duas regiões terminais de 23 pares de bases que constituem uma perfeita repetição invertida. Sequências homólogas do elemento de inserção IS1151 foram encontradas em algumas amostras que não produzem toxina épsilon (Daube et al., 1993).

As diferenças encontradas na sequência de nucleotídeos anterior ao gene *etx*, em amostras distintas de *C. perfringens* tipo D, contribuem para a variação na produção da toxina épsilon (Havard et al., 1992). Além disso, a localização do elemento de inserção IS1151 próxima ao gene estrutural *etx* sugere alguma relação com a transferência gênica da virulência em amostras isoladas, interferindo diretamente na produção de toxina (Lyras e Rood, 1997).

Bentancor et al. (1999b) correlacionaram a produção de toxina épsilon de amostras de *C. perfringens* tipo D com a presença do gene *etx* e confirmaram a presença do gene em todas as amostras testadas. A diferente localização dos genes de virulência em outras espécies do gênero *Clostridium* sugerem a possível associação entre o nível de expressão de toxina e a localização do gene *etx*. O gene *etx* foi encontrado somente em plasmídios de alto peso molecular. Essa associação é correlacionada com o nível de produção de toxina épsilon e com a estabilidade da

expressão durante várias passagens *in vitro*. Foi observado que em diferentes amostras, o peso molecular dos plasmídios que carregam o gene *etx* é variável e o nível de expressão de toxina sugere uma possível relação com outros genes de virulência ou ainda, que o gene pode estar envolvido em vários mecanismos de repressão/indução, dependendo de sua localização.

A localização do *etx* em plasmídios pode estar associada com a produção da toxina épsilon e com a estabilidade da expressão durante várias passagens *in vitro*. Para a obtenção de vacinas e outros produtos biológicos é necessário selecionar amostras que possuem alta e persistente produção de toxina (Bentancor et al., 1999a).

A reação em cadeia da polimerase baseada na amplificação de DNA dos genes para as toxinas alfa, beta, épsilon e iota de *C. perfringens* tem sido desenvolvida para a rápida e precisa tipagem deste microrganismo (Uzal et al, 1996; Miserez et al, 1998). Gkiourtzidis et al. (2001) demonstraram que o método de PCR para tipagem dos genes das toxinas é aplicável para a análise de grandes números de amostras bacterianas e tem mostrado ser um método rápido e eficiente para investigações epidemiológicas de doenças clostridiais em animais. Yoo (1997) padronizou uma PCR multiplex para tipagem de *C. perfringens* na tentativa de substituir o método clássico de soroneutralização em camundongos e demonstrou a alta sensibilidade do teste.

Gaber e Kapil (1999) desenvolveram um "dot blot" para detecção rápida de proteínas virais sendo considerado um método sensível e específico, podendo testar um grande número de amostras simultaneamente. Panigrahi et al. (1987) padronizaram um "dot blot" para detecção de enterotoxinas em amostras bacterianas obtendo alta sensibilidade, rapidez e sendo dispensável a utilização de equipamentos especializados.

A vacinação é amplamente utilizada no controle da enterotoxemia causada por *C. perfringens*. Entretanto, a qualidade das

vacinas varia enormemente entre os países e indústrias produtoras, e essas vacinas não são sempre transportadas, estocadas e/ou administradas corretamente. Em adição, variações individuais nas respostas de anticorpos ocorrem freqüentemente entre os animais (Uzal et al., 1997). As vacinas comerciais contra clostridioses são combinadas ou compostas por múltiplos antígenos e são usadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e/ou suas toxinas que podem participar das enfermidades.

Azevedo (1997) verificou que a obtenção de toxóides eficientes está diretamente relacionada com o título de toxina obtido *in vitro*. Variações na composição do meio de cultura, escolha da amostra a ser utilizada e tempo de incubação têm sido avaliados por diversos pesquisadores na produção de toxinas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e no Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LARA/PL) em Pedro Leopoldo/MG.

#### 3.2. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 e 22 gramas, cedidos pelo LARA/PL.

#### 3.3. Amostras

Foram utilizadas duas amostras de *Clostridium perfringens* tipo D pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG, sendo a amostra 1, doada pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Bariloche – Argentina e a amostra 2, obtida de um isolado de campo. As amostras previamente tipificadas e identificadas pela técnica de PCR,

segundo a metodologia descrita por Uzal et al. (1996), foram mantidas liofilizadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.1. Meios de cultura

Foram utilizados caldo Brain Heart Infuse – (BHI) (Difco Laboratories, E.U.A.), Perfringens Selective Agar – Sulfite-Polymyxin-Sulfadiazine – (SPS) (Difco Laboratories, E.U.A.), Agar Sangue base Muller-Hinton com 5% de sangue de equino e Meio para Produção de Toxinas – (MPT), pH 7,2 (Lobato et al., 2000).

#### 3.3.2. Reconstituição das amostras e avaliação da pureza

As amostras foram reconstituídas em 1ml de caldo BHI semeadas em duplicata, em tubos de ensaio (16X160mm) com tampa de rosca contendo 9ml de caldo BHI e incubadas em anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Todas as incubações foram feitas em jarras de anaerobiose contendo mistura gasosa (10% de  $\text{CO}_2$ , 10% de  $\text{H}_2$  e 80% de  $\text{N}_2$ ). Após crescimento observado por intensa produção de gás e turvação do meio, as amostras foram semeadas em placas de agar sangue com 5% de sangue de equino e em placas de agar SPS e reincubadas em anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Foram feitas coloração pelo Gram e provas bioquímicas como fermentação da glicose, maltose e sacarose, para avaliação da pureza das amostras.

#### 3.4. Diluição das amostras e obtenção de colônias isoladas

As amostras inicialmente cultivadas em caldo BHI foram diluídas (fator de diluição 10) em salina peptonada 1 % e 100 $\mu\text{l}$  das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  foram semeados em placas de agar SPS com alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas em anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

#### 3.4.1. Seleção das colônias isoladas crescidas nas maiores diluições e inoculação em MPT

Foi feita a contagem do número de colônias isoladas por diluição e em seguida 48



colônias das maiores diluições, foram transferidas uma a uma, com auxílio de palito estéril, para cada poço de duas placas de cultura de célula de 24 poços contendo 2ml de MPT. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 8 horas, e em seguida centrifugadas a 8000 x g por 15 minutos a 4°C.

### **3.5. Padronização do “dot blot” para seleção de colônias isoladas produtoras de toxina épsilon**

Para padronização do “dot blot” foi utilizada toxina épsilon produzida e purificada de acordo com a metodologia descrita por Parreiras et al (2002), anti-toxina épsilon produzida em carneiro (Parreiras e Lobato, 2001) e conjugado anti-imunoglobulina de carneiro produzido em coelho, marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, E.U.A.), testados em diferentes diluições. Como controle positivo foi utilizada toxina épsilon produzida e purificada de acordo com a metodologia descrita por Parreiras et al. (2002) na concentração de 10µg/ml diluída em MPT; e como controle negativo foi utilizado MPT.

#### **3.5.1. Utilização do “dot blot” para seleção de clones produtores de toxina épsilon**

Membrana de nitrocelulose 0,45µm (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.), umedecida em tampão “Tris Buffer Saline” – (TBS) (0,02M de Tris, 0,5M de NaCl, pH 7,5) foi sensibilizada com 200µl do sobrenadante de cada poço das placas de cultura de célula centrifugadas. Após fixação na membrana foram adicionados 100µl de solução bloqueadora contendo “Bovine Serum Albumin” – (BSA) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) 1% em TBS. Foram feitas três lavagens sucessivas utilizando-se “Tris Tween Buffer Saline” – (TTBS) (0,02M de Tris, 0,5M de NaCl, 50% de Tween 20, pH 7,5) e foram adicionados 100µl de solução de anti-toxina épsilon diluída em BSA 1% (1:300). Novamente foram feitas três lavagens sucessivas utilizando-se TTBS e foram adicionados 100µl do conjugado anti-imunoglobulina de carneiro, diluído em BSA 1% (1:3000). A reação foi revelada utilizando-se o Kit DAB – 3,3’-

diaminobenzidina (Vector Laboratories, E.U.A.) preparado conforme as recomendações do fabricante, e após cinco minutos lavado com água destilada.

### **3.6. Seleção dos clones e titulação da toxina épsilon**

As 48 colônias isoladas e selecionadas das maiores diluições das amostras 1 e 2 foram cultivadas por 8 horas em anaerobiose em MPT a 37°C e submetidas ao teste de “dot blot”. Foram selecionados clones positivos e negativos de acordo com a intensidade de cor observada. Foram feitas três seleções consecutivas sendo escolhidos dois clones positivos a cada teste. Um clone negativo foi selecionado apenas da amostra 1, subcultivado em BHI, recloneado, e selecionado para titulação em camundongo e teste de PCR.

Os clones selecionados foram repicados em BHI e a produção de toxina épsilon para titulação foi realizada segundo Azevedo et al. (1998) transferindo-se 5ml do inóculo obtido em caldo BHI diretamente para 500ml do MPT e incubado em anaerobiose a 37°C, por 8 horas. Após incubação, o cultivo foi centrifugado a 8000 x g, por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para titulação da toxina épsilon por bioensaio em camundongos.

Os clones positivos que apresentaram maior título de toxina épsilon foram novamente semeados em BHI e diluídos para obtenção de novas colônias isoladas e seleção de novos clones toxigênicos repetindo-se as clonagens por mais três vezes.

#### **3.6.1. Titulação em camundongos**

O sobrenadante das culturas foi ativado com solução de tripsina segundo a metodologia descrita por Sebald e Petit (1997) durante 30 minutos em banho-maria a 37°C e após este período, os tubos contendo os sobrenadantes foram colocados em banho de gelo e diluições decimais foram feitas em salina peptonada a 1% para a determinação da dose mínima mortal – DMM (menor quantidade de toxina que mata 100% dos

animais inoculados). Para cada diluição, foram inoculados dois camundongos pesando entre 17 e 22 gramas, com 0,2ml por via endovenosa e os animais foram observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida uma vez e os resultados dos dois testes foram acumulados para efeito de cálculo da DMM (Sebald e Petit, 1997).

### 3.7. Determinação do limite de detecção do “dot blot”

Para se estabelecer o limite do método “dot blot” na detecção de toxina épsilon foram utilizadas 18 diluições (fator de diluição 2) da toxina épsilon partindo-se da concentração inicial de 10µg/ml até 7,5ng/ml. Como diluente e como controle negativo foi utilizado MPT. A leitura foi feita visualmente de acordo com a intensidade de cor obtida em cada poço.

### 3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os clones positivos e negativos selecionados das duas amostras foram submetidos à PCR para verificar a presença do gene *etx*. A PCR foi realizada de acordo com a técnica descrita por Uzal et al. (1996) utilizando-se como controle positivo uma amostra de referência de *C. perfringens* tipo D (A.T.C.C. – 3629) e como controle negativo todos os reagentes da PCR sem o DNA.

#### 3.8.1. Iniciadores

Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores – senso: 5’-TACTCATACTGTGGGAAGTTCGATACAA GC-3’ e anti-senso: 5’-CTCATCTCCCATAACTGCACTATAATTC C-3’; para um produto amplificado de 403 pares de bases (bp).

### 3.9. Determinação da concentração celular das amostras de *C. perfringens* tipo D

#### 3.9.1. Concentração celular das colônias isoladas medida por densidade ótica (DO)

Para verificar a homogeneidade na concentração celular das colônias isoladas crescidas nas placas de 24 poços foi medida a densidade ótica (DO) a 600 nm. As colônias crescidas por 8 horas, foram ressuspensas em MPT e lidas diretamente em espectrofotômetro. Os valores foram anotados e a média e o desvio padrão calculados através do programa Microsoft®Excel versão 97.

#### 3.9.2. Concentração celular das amostras medida por densidade ótica (DO)

Um inóculo de 5ml das duas amostras de *C. perfringens* tipo D estudadas, foi inicialmente cultivado em BHI conforme o item 3.3.2. foi transferido para 500ml de MPT e incubado em anaerobiose a 37°C por 10 horas. Foram coletadas alíquotas de 5ml das amostras a cada hora e a concentração celular quantificada através da medida da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro a 600nm. As amostras foram lidas diretamente até valores de absorbância de aproximadamente 0,7, acima destes valores, foram diluídas 1:10 em meio de cultura estéril antes de se proceder a leitura. O valor lido foi multiplicado pelo fator de diluição para fornecer a medida da concentração celular segundo a metodologia descrita por Mozzer (2004).

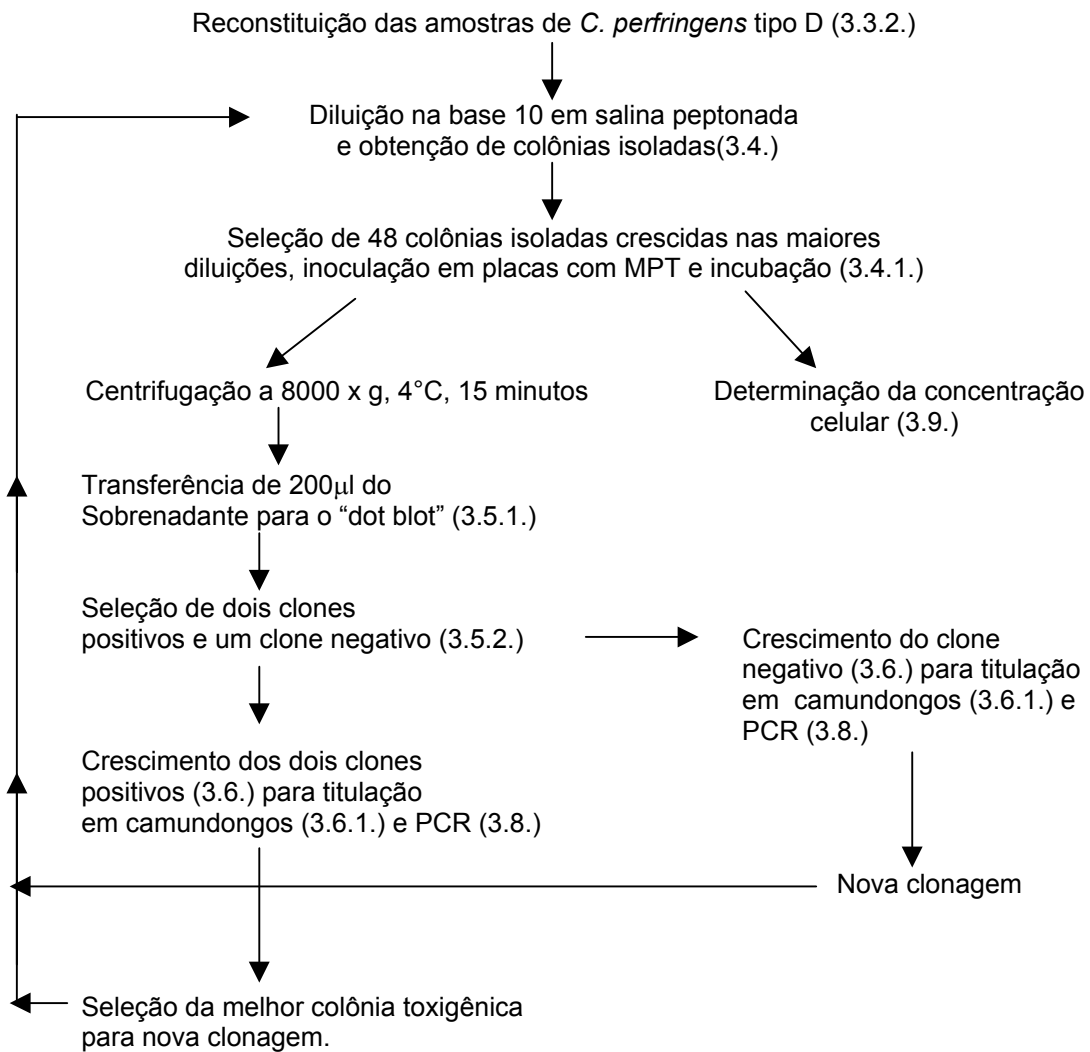


Figura 1 – Resumo da metodologia desenvolvida neste trabalho.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras utilizadas neste experimento após semeadas em agar sangue por 24 horas, apresentaram colônias lisas e brilhantes de cor acinzentada, rodeadas por uma zona de dupla hemólise. À coloração pelo Gram foram vistos apenas bastonetes Gram-positivo confirmando a pureza das amostras. No agar SPS houve crescimento de colônias negras características de agentes sulfito redutores tais como *C. perfringens*. Nas provas de fermentação da glicose, maltose e sacarose, as amostras foram positivas.

As diluições dos reagentes previamente padronizados para o teste de “dot blot” foram de 1:300 para a anti-toxina épsilon e 1:3000 para a anti-imunoglobulina de carneiro peroxidase, escolhidas de acordo com a intensidade de cor obtida em cada poço inclusive no controle negativo. A toxina

épsilon purificada foi utilizada como controle positivo na concentração de 10µg/ml.

As Figuras 2 e 3 mostram os resultados dos “dot blots” das amostras 1 e 2, respectivamente, nas diferentes seleções.

Na primeira seleção da amostra 1 (Figura 2A) foram considerados 10 clones positivos e 38 clones negativos. Na terceira seleção (Figura 2B) 48 clones foram considerados positivos.

Na primeira seleção da amostra 2 (Figura 3A) foram considerados quase todos os clones negativos, podendo ser observado na linha G, clones fracamente positivos, que foram selecionadas. Na terceira seleção (Figura 3B) 48 clones foram considerados positivos.

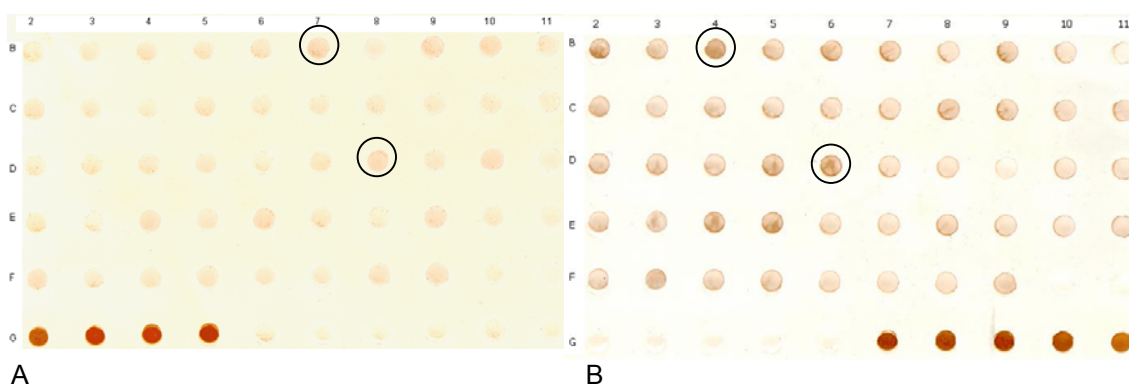


Figura 2 – “Dot blot” de 48 colônias isoladas da amostra 1 de *C. perfringens* tipo D na primeira (A) e na terceira seleção (B). Na Figura 2A os controles positivos são: 2G, 3G, 4G e 5G; e os controles negativos: F10, F11, G6, G7, G8, G9, G10 e G11. Na Figura 2B os controles positivos são: G7, G8, G9, G10 e G11; e os controles negativos: F10, F11, G2, G3, G4, G5 e G6.



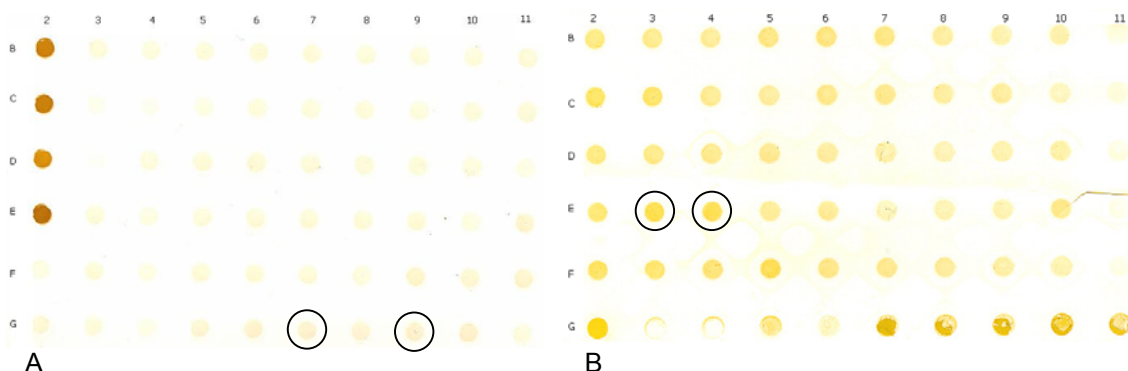


Figura 3 – “Dot blot” de 48 colônias isoladas da amostra 2 de *C. perfringens* tipo D na primeira (A) e na terceira seleção (B). Na Figura 3A os controles positivos são: B2, C2, D2 e E2; e os controles negativos: B3, C3, D3 e E3. Na Figura 3B os controles positivos são: B7, B8, B9, B10 e B11; e os controles negativos: B1, C1, D1, E1 e F1.

O clone negativo selecionado no primeiro “dot blot” da amostra 1 foi novamente clonado e o resultado mostrado na Figura 4.

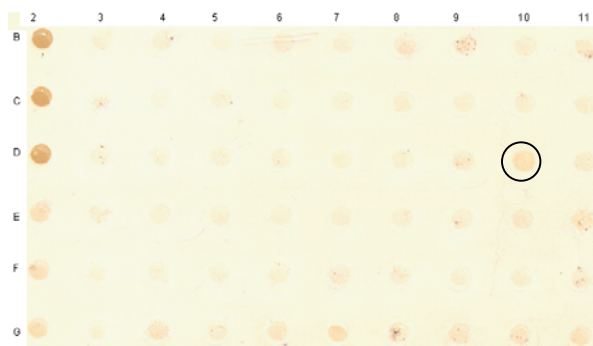


Figura 4 – “Dot blot” de 48 colônias isoladas do clone negativo da amostra 1 de *C. perfringens* tipo D. Os controles positivos são B2, C2 e D2, e os controles negativos E2, F2 e G2.

Os resultados do “dot blot” do clone negativo da amostra 1 foram considerados negativos de acordo com o controle, porém, observaram-se variações entre as colorações das colônias isoladas. Este resultado pode ser justificado pelo clone negativo ter sido selecionado de uma amostra inicialmente toxigênica e sugere a heterogeneidade das amostras de *C. perfringens* tipo D. Considerando que as amostras bacterianas representam uma mistura de populações heterogêneas, algumas produzindo títulos variáveis de

toxina épsilon, outras não apresentando nenhum título e a sequência gênica *etx* que codifica para síntese de toxina épsilon é localizada em um grande plasmídio. A transferência lateral desse plasmídio e/ou sua perda para o meio contribuem para mudanças toxintípicas observadas em algumas amostras (Petit et al., 1999).

Neste trabalho não foi avaliada a perda de plasmídios pelos clones selecionados. As passagens sucessivas *in vitro* podem tornar as amostras menos toxigênicas devido a perda do plasmídio sendo necessárias periódicas seleções de clones produtores de toxina. Estes resultados confirmam os achados de Bentancor et al., (1999a).

A seleção de amostras pelo “dot blot” mostrou-se eficiente para obtenção de clones toxigênicos. Essa toxigenicidade pode estar relacionada a seleção de clones que possuíam plasmídios de alto peso molecular que carregam o gene *etx*.

No bioensaio em camundongos dos cultivos obtidos dos clones selecionados pelo “dot blot”, a amostra 1 tinha título inicial de 1000 DMM/ml e após a terceira seleção o título foi de 3650 DMM/ml, o que representou um aumento de 3,65 vezes. A amostra 2 só provocou a morte dos camundongos quando inoculada pura, mas após a terceira seleção o título foi de 1000 DMM/ml, representando um aumento de título 1000 vezes maior que a amostra inicial (Figura 5).

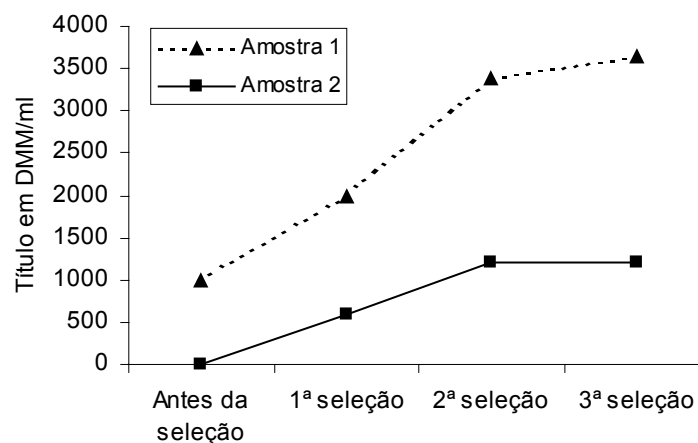


Figura 5 – Titulação em camundongos dos clones das amostras de *C. perfringens* tipo D selecionados pelo “dot blot”.

A Figura 5 representa o aumento no título das amostras antes do “dot blot” até a terceira seleção. As seleções foram feitas baseando-se nos resultados encontrados, a amostra 1, apresentou pequeno aumento da segunda para a terceira seleção e na amostra 2, o título se manteve na segunda e na terceira seleção.

Assim como o clone da amostra 1 negativo ao “dot blot”, apresentou na segunda seleção título de 600 DMM/ml e foi selecionado de uma amostra sabidamente toxigênica. O aumento da toxigenicidade das amostras 1 e 2 pode estar relacionado com a seleção de colônias cada vez mais homogêneas a cada passagem ou ainda com fatores relacionados à expressão do gene *etx*.



A sensibilidade do “dot blot” para detecção de toxina épsilon verificada neste experimento foi menor que a obtida por Nagahama et al. (1991) que padronizaram um ELISA para detecção rápida de toxinas de *C. perfringens* obtendo sensibilidade de 0,1ng/ml de toxina épsilon purificada.

O “dot blot” foi capaz de detectar até 9ng/ml de toxina épsilon diluída em MPT (Figura 6). Este resultado foi satisfatório para seleção de colônias produtoras de toxina épsilon com maiores títulos.

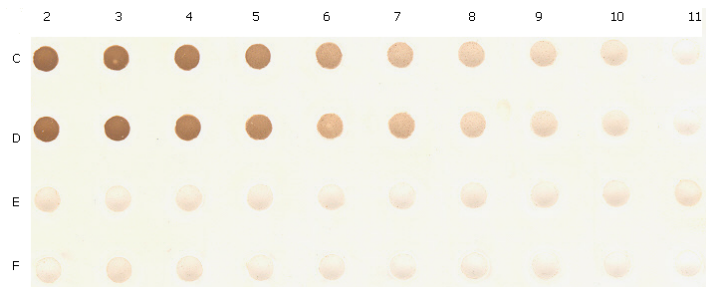


Figura 6 – Sensibilidade do “dot blot” utilizando-se toxina épsilon a partir da concentração de 10µg/ml (C2 e D2). C11, D11, E11 e F11, controles negativos.

A utilização do teste de “dot blot” para seleção de colônias produtoras de toxina épsilon pode ser uma alternativa para obtenção de cultivos com altos títulos de toxina, que são de grande importância principalmente na produção de vacinas múltiplas, que é um dos desafios para a indústria veterinária, pela necessidade de se colocar um número cada vez maior de antígenos no mesmo volume da dose vacinal.

O “dot blot” é um teste subjetivo sendo capaz de selecionar características fenotípicas das amostras dependendo do observador, porém, demonstrou-se suficiente para os objetivos deste experimento.

A confirmação da presença do gene *etx* que codifica a síntese da toxina, e a sua expressão, são medidas importantes para a seleção de amostras vacinais.

Todas as amostras testadas pela PCR foram positivas ao gene *etx* inclusive as negativas no “dot blot” (Figura 7). Este resultado comprova que a presença do gene *etx* é um fator necessário mas não suficiente em função da quantidade e qualidade de toxina épsilon produzida por uma amostra de acordo com Bentancor et al. (1999a) ou que o “dot blot” não foi sensível o suficiente para detectar pequenas quantidades da toxina épsilon produzida pelos clones considerados negativos, de acordo com a intensidade da cor observada, tendo como referência o controle negativo utilizado.



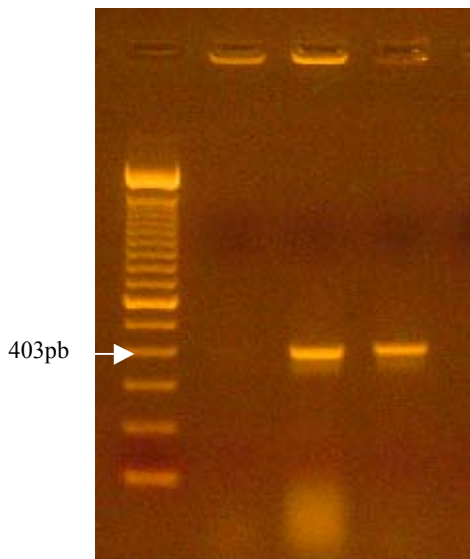


Figura 7 – Gel de agarose dos produtos da PCR do clone negativo selecionado no “dot blot”: 1) marcador de peso molecular; 2) controle negativo; 3) clone positivo; 4) clone negativo.

Fatores de transcrição, tradução, terminação e secreção do complexo protéico condicionam a produção efetiva de toxina e precisam ser estudados futuramente.

Miserez et al. (1998) utilizaram a PCR para diagnóstico de enterotoxemia causada por *C. perfringens* tipo D e observaram que todas as amostras de todos os animais com sinais patológicos de enterotoxemia tinham

o gene *etx* enquanto apenas duas das amostras de 13 animais aparentemente saudáveis continham o gene da toxina épsilon. Esses resultados estão de acordo com os achados neste experimento confirmando que em todos os clones selecionados, inclusive no negativo, foi detectada a presença do gene *etx*, conseqüentemente houve produção de toxina épsilon por todas as amostras, ainda que com baixo títulos.

Os resultados da PCR para detecção de *C. perfringens* produtores de toxina épsilon demonstraram um produto amplificado de 403 pares de bases. O mesmo resultado foi obtido por Uzal et al. (1996) associado a alta sensibilidade que variou de  $1,4 \times 10^2$  a  $1,4 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de fezes ou conteúdo intestinal.

O estudo da concentração celular das amostras de *C. perfringens* tipo D foi importante para comprovar que a variação na quantidade de toxina produzida e detectada no “dot blot” não era devida à um número maior ou menor de células bacterianas presentes em cada poço das placas de cultura.

A média das leituras das 48 colônias isoladas da amostra 1, foi de 1,034 sendo o desvio padrão de 0,062 e o coeficiente de variação igual a 6,4%. A Figura 8 demonstra a correlação em DO das 48 colônias isoladas da amostra 1.



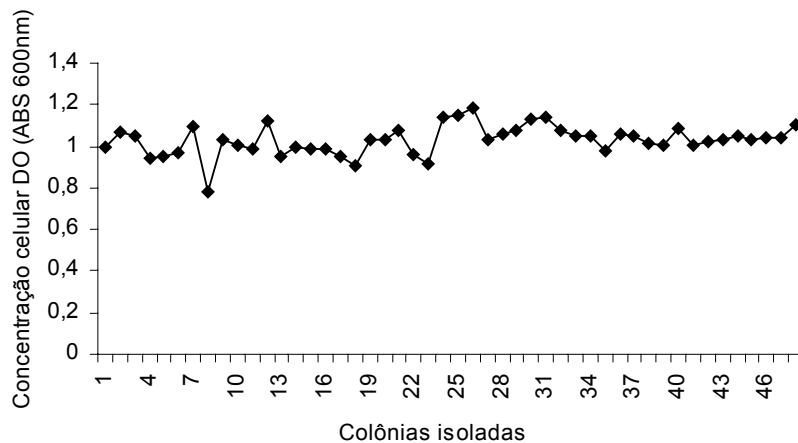


Figura 8 – Correlação celular das colônias isoladas de *C. perfringens* tipo D após cultivo em MPT por 8 horas a 37°C, medida pela densidade ótica (DO) a 600nm.

Esta pequena variação na DO observada entre as 48 colônias isoladas selecionadas mostra que as mesmas apresentaram crescimento homogêneo após 8 horas de incubação culminando com um número semelhante de células bacterianas. Assim comprova-se que a diferença da intensidade de cor observada no “dot blot” se deve à

capacidade de cada uma das colônias clonadas produzirem toxina épsilon.

A correlação entre a concentração celular medida pela densidade ótica (DO) a cada hora de incubação das amostras 1 e 2 foi determinada e os resultados mostrados na Figura 9.

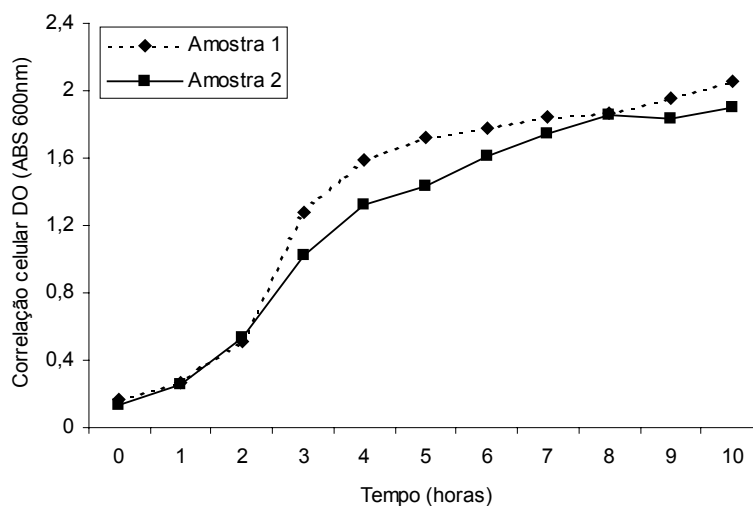


Figura 9 – Concentração celular das amostras 1 e 2 de *C. perfringens* tipo D após cultivo em MPT por 10 horas a 37°C, medida pela densidade ótica (DO) a 600 nm.

As amostras 1 e 2 apresentaram a mesma concentração celular no tempo de 8 horas de incubação porém títulos diferentes de toxina épsilon no sobrenadante das culturas (Figura 5). *C. perfringens* tipo D produz toxinas na fase exponencial de crescimento correspondendo a um período de incubação de 3 a 9 horas, sendo 8 horas um período suficiente para produção de toxina épsilon, conforme comprovado por Azevedo (1997). Contudo, apenas a medida da concentração celular não é suficiente para determinar o tempo de produção de toxina pelas amostras. É necessário que se faça um estudo individual de cada amostra a ser utilizada para se determinar o melhor tempo de produção de toxinas independentemente da concentração de células bacterianas no meio.

## 5. CONCLUSÕES

- O teste de “dot blot” padronizado é eficiente para selecionar colônias toxigênicas de *C. perfringens* tipo D.
- Os títulos dos clones selecionados das amostras de *C. perfringens* tipo D, em dose mínima mortal, foram significativamente mais altos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, E.O. *Avaliação de vacinas contra Clostridium perfringens tipo C e D*. 1997. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo C e D. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 50, n. 3, p. 239–242, 1998.

BENTANCOR, A.B.; FERMEPIN, M.R.; BENTANCOR, L.D.; et al. Detection of the *etx* gene ( $\epsilon$ -toxin inducer) in plasmids of high molecular weight in *Clostridium perfringens* type D. *FEMS Immun Med Microbiol*, v. 24, p. 373–377, 1999a.

BENTANCOR, A.B.; FERMEPIN, M.R.; SKIRMUNTT, V.; et al. Detección del gen *etx* (toxina épsilon) de *Clostridium perfringens* para optimizar la formulación de vacunas. *InVet*, v. 1, n. 1, p. 67–74, 1999b.

DAUBE, G.; SIMON, P.; KAECKENBEECK, A. IS1151 an IS-like element of *Clostridium perfringens*. *Nucl Acids Res*, v. 21, n. 2, p.352, 1993.

EL IDRISSE, A.H.; WARD, G.E. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Vet Microbiol*, v. 31, n. 1, p. 89–99, 1992.

GABER, F.; KAPIL, S. Development of an antigen spot test for detection of coronavirus in bovine fecal samples. *Clin Diag Lab Immunol*, v. 6, n. 4, p.542–544, 1999.

GKIOURTZIDIS, K.; FREY, J.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; et al. PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta$ 2-,  $\epsilon$ -,  $\iota$ - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol*, v. 82, n. 1, p.39–43, 2001.

HAVARD, H.L.; HUNTER, S.E.; TITBALL, R.W. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and type D. *FEMS Microbiol Lett*, v. 76, n. 1-2, p. 77–81, 1992.

HUNTER, S.E.C.; CLARKE, I.N.; KELLY, D.C., et al. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Inf Immun*, v. 60, n. 1, p.102–110, 1992.

JOHNSON, E.A. Extrachromosomal virulence determinants in the Clostridia. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; et al. *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 3, p. 35–48.

- LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 52, n. 4, p. 313–318, 2000.
- LYRAS, D., ROOD, J.I. Transposable genetic elements and antibiotic resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; et al. *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 6, p. 73–92.
- MISEREZ, R.; FREY, J.; BUOGO, C.; et al. Detection of  $\alpha$ - and  $\epsilon$ - toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). *Lett Appl Microbiol*, v. 26, n. 5, p. 382–386, 1998.
- MOZZER, O.D. *Cultivo do Clostridium botulinum tipo D em alta densidade visando à fabricação de vacinas veterinárias*. 2004. 149f. Tese (Doutorado em Interunidades em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S.; et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 68, n. 1, p.41–44, 1991.
- PANIGRAHI, D.; BURKS, M.; HARIHARAN, H.; et al. Evaluation of immuno-dot-blot assay for detection of cholera-related enterotoxin antigen in *Salmonella typhimurium*. *J Clin Microbiol*, v. 25, n. 4, p.702–705, 1987.
- PARREIRAS, P.M.; LOBATO, F.C.F. *ELISA competitivo para detecção de imunoglobulina antiprototoxina épsilon produzida pelo Clostridium perfringens tipo D*. 2001. 44 fl. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PARREIRAS, P.M.; LOBATO, F.C.F.; HENEINE, L.G.D.; et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 54, n. 3, p. 328–330, 2002.
- PAYNE, D.; OYSTON, P. The *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -toxin. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; et al. *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 25, p.439–447.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*, v. 7, n. 3, p. 104–109, 1999.
- SEBALD, M.; PETIT, J.C. *Laboratory methods anaerobic bacteria and their identification*. 2. ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p.189–197.
- SONGER, J.G. Clostridial diseases of animals. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; et al. *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. Cap. 3, p. 154–182.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.;BLACKALL, L.L; et al Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Lett Appl Microbiol*, v. 23, n. 1, p.13–17, 1996.
- UZAL, F.A.; NIELSEN, K.; KELLY, W.R. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Vet Microbiol*, v.51, n. 2–3, p.223-231, 1997.
- UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in goats. *Vet Pathol*, v. 35, n. 2, p.132–140, 1998.
- YOO, H.S.; LEE, S.U.; PARK, K.Y.; et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, v.35, n.1, p.228-232, 1997.