

Ronnie Antunes de Assis

MIONECROSES: ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Co-Orientador: Prof. Francisco Alejandro Uzal

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2005

**A848m Assis, Ronnie Antunes de, 1975-
Mionecroses: estudos epidemiológicos e moleculares /
Ronnie Antunes de Assis. – 2005.
70 p. : il.**

**Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientador: Francisco Alejandro Uzal
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia**

**1. *Clostridium* – Teses. 2. Reação em cadeia da polimerase -
Teses. 3. Epidemiologia – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos
Faria. II. Uzal, Francisco Alejandro. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.**

CDD – 616.931

Tese Defendida e Aprovada em 30/03/2005, pela Comissão Examinadora Constituída por:



Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato
Orientador



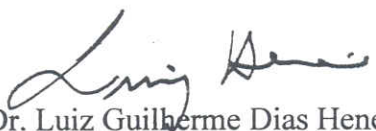
Profa Dra. Vera Lucia Viegas de Abreu



Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Dr. Maurilio Andrade Rocha



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Este trabalho é dedicado acima de tudo a Deus e Jesus Cristo, meus guias.

Aos meus pais, por ter chegado onde estou e, principalmente por terem privado seus sonhos a favor dos meus.

Aos meus irmãos e familiares pela força que nos une.

A minha esposa Kelly pela compreensão, carinho, respeito e paciência. Muito obrigado por tudo.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço incondicionalmente ao Prof. Francisco Lobato pela competente orientação, amizade, incentivo, aconselhamentos, preocupar sobretudo com minha formação profissional e amadurecimento pessoal e profissional. O Prof. Francisco Lobato, dentre outros me propiciou a grandiosa oportunidade de ingressar na Pós-Graduação e, eu o tenho como meu segundo Pai terreno. O Prof. Francisco mesmo na condição de Vice-Diretor da Escola de Veterinária da UFMG, sempre esteve presente comigo e me deu total autonomia para realização deste trabalho, acreditando mais do que a mim, que eu poderia conseguir...

Ao Prof. Francisco Uzal (Paco) pela Co-Orientação, amizade, respeito, consideração a minha pessoa, à grandiosa parceria feita com o Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG e por permitir-me estagiar no seu Laboratório (INTA/ Bariloche/Argentina), onde pude dar os primeiros passos na Biologia Molecular.

A Profa Vera Lúcia Viegas de Abreu pela amizade, carinho, valorização do meu trabalho e minha pessoa e, pela constante ajuda em nossos trabalhos, em especial a esta tese.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pelas palavras positivas de conforto, incentivo, ter sido o meu incentivador juntamente com o Prof. Francisco Lobato pela minha transposição para o Doutorado. Na época que esteve sob a direção do Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação, exerceu o Cargo de Chefe com grande Maestria, levando o Curso de Doutorado em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como o melhor do Brasil.

Ao Prof. Maurílio Andrade Rocha pela gentileza, amizade, estar sempre pronto a contribuir e, importantes contribuições e valorização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela cordialidade, amizade, importantes contribuições e valorização deste trabalho, humanismo e, preocupação com minha formação profissional e pessoal.

Ao amigo Nelson Éder, uma das pessoas mais humanas que já conheci.

Aos Profs. Zélia Lobato e Andrey Pereira Lage pelo carinho,*amizade e por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao Prof. Élvio Carlos Moreira pelas valiosas contribuições deste trabalho durante a seleção do Doutorado e Valorização do Projeto.

Aos Profs da Escola de Veterinária da UFMG: Rogéria Serakides, Renato de Lima Santos, Ivan Barbosa Machado Sampaio, Nélon Rodrigo Martins, José Sérgio, Paulo Roberto de Oliveira, Romário Cerqueira Leite e Elias Jorge Facury Filho pela Valorização do meu trabalho e pessoa. Aos Profs Marcelo Resende Souza, Cláudia Moraes e Mônica Cerqueira Pinho Leite pela amizade e afeto.

Ao Prof. Roberto Baracat de Araújo pelo reconhecimento do meu trabalho e o sério comprometimento com a Diretoria da Escola de Veterinária da UFMG.

Aos demais Professores do Depto de Medicina Veterinária Preventiva e da Escola de Veterinária da UFMG pela pronta ajuda.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG pelo companheirismo, amizade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos Estimados Amigos do LARA-MG, Drs: Tomaz de Aquino Porfírio, Ricardo Aurélio Pinto do Nascimento, Massami Nakajima, Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota, Anapolino Macedo de Oliveira, Marcelo Fernandes Camargos por terem permitido no momento de maior dificuldade juntamente com a ajuda do Prof. Francisco Lobato, que eu pudesse ter a honrosa oportunidade de realizar grande parte do meu experimento nas dependências do LARA-MG, além do companheirismo e amizade. Aos demais funcionários do LARA-MG pelo companheirismo, amizade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos Setores de Botulismo, Virologia, Imuno-Química, Tuberculose e Microbiologia do LARA-MG pela realização dos experimentos.

Ao Dr. Ricardo Aurélio Pinto do Nascimento pela amizade, preocupação com minha pessoa e parceria de trabalho.

Ao Dr. Maurício Baltazar de Carvalho Filho do LARA-MG pelas ajudas no inglês e parceria de trabalho.

Em especial ao Dr. Marcelo Fernandes Camargos, por ter sido meu braço direito durante a execução dos trabalhos no LARA-MG. Tenho o Marcelo como um irmão...

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios da UFMG: Luciana Aramuni, Milton Formiga de Souza Júnior, Eduardo Lima, Andréa Vieira, Theonys Diógenes de Freitas, Felipe, Leonardo, João, etc. Aos que aqui estiveram: Lili, Augusto, Dra. Patrícia Parreiras, Carlos, Michele, Guilherme, etc pela prazerosa convivência.

Ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG que me acolheu e fez parte da sua história, aos clostrídios, aos animais experimentais, meu muito obrigado.

Aos amigos que fiz no INTA/Bariloche/Argentina; Elma Vidál, Winston Morris, Raúl Cabrera, Layana, Mariano, etc.

Aos Profs. Geraldo Márcio da Costa (UFLA-MG), Lúcia Baldassi (IBSP), Ana Lúcia Schield (UFP), Agueda Castagna de Vargas (UFMS), Ricardo Lemos (UFMS), Rogéria Serakides (UFMG) e ao PESAGRO-RJ por disponibilizarem as amostras de clostrídios e materiais para este estudo. À Dra. Akemi Kojima (NVAL, Japão) pelo envio de artigos para qualificação e valiosas sugestões no Projeto.

A Nádia pela formatação da tese.

Ao Prof. Vasco Azevedo (ICB) pela grandiosa oportunidade de estagiar no seu Laboratório e, aos seus Alunos em Especial ao Dr. Anderson Miyoshi pelos ensinamentos e ajuda durante o período que lá estive.

A FAPEMIG e a FEP-MVZ Coordenação Preventiva por financiar este trabalho e ao CNPq pela Bolsa de Estudo.

Aos que demais que esqueci, minhas sinceras desculpas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

*“Para ser grande, seja inteiro.
Nada seu exagera ou exclui.
Seja todo em cada coisa.
Põe tudo o que você é no mínimo que faz”*

Fernando Pessoa

Mas os que esperam no Senhor retemperam a sua energia: tomam a envergadura das águias, laçam-se e não se fatigam, avançam e não fraquejam.

Isaías 40:31

...O único que é digno de receber a honra, a glória e o poder, é o Deus eterno imortal, invisível, mas real...

Estou imbuído de duas profundas impressões; a primeira, que a Ciência não conhece países; a segunda, que a Ciência é a mais alta personificação de uma nação. A Ciência não conhece países, porque o conhecimento pertence à humanidade, e ela é a tocha que ilumina o mundo. A Ciência é a mais alta personificação de uma nação, porque a primeira dentre as nações será aquela que levar mais longe os trabalhos do pensamento e da inteligência. Tomem interesse eu lhes imploro, naquelas sagradas instituições que designamos sob o expressivo nome de Laboratórios. Peçam que elas sejam multiplicadas e adornadas, eles são os templos da riqueza e do futuro. Lá é que a humanidade cresce, torna-se mais forte e melhor. Lá ela aprende a ler nos trabalhos da Natureza, símbolos do progresso e da harmonia universal, enquanto que os trabalhos do ser humano são freqüentemente aqueles do fanatismo e da destruição. Jovens tenham fé nos métodos eficientes e seguros dos quais ainda não conhecemos todos os segredos. E, qualquer que seja vossa carreira, não vos deixes desencorajar pela tristeza de certas horas que passam sobre as nações. Vivam na paz serena dos Laboratórios e Bibliotecas...

Pasteur. In: Pasteur e a Ciência Moderna-René Dubos.

Tal Ciência é Grandiosa Que Não Alcanço-a de Tão Alta...

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1.....	17
2. IDENTIFICAÇÃO DE <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium chauvoei</i> E <i>Clostridium sordellii</i> EM CASOS CLÍNICOS.....	17
2.1. Surto de gangrena gasosa em bovinos	18
RESUMO	18
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.2. Surto de mionecroses em ovinos por <i>Clostridium chauvoei</i> após vacinação contra linfadenite caseosa.....	24
RESUMO	24
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
2.3. Surto de gangrena gasosa em ovinos por <i>Clostridium sordellii</i> após vacinação contra clostridioses	28
RESUMO	28
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CAPÍTULO 2.....	31
3. ESTUDO RETROSPECTIVO DE MIONECROSES EM AMOSTRAS CLÍNICAS PARAFINIZADAS.....	31
3.1. Estudo retrospectivo de mionecroses em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina por uma técnica de estreptavidina-biotina peroxidase.....	32
RESUMO	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

CAPÍTULO 3.....	39
4. PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Clostridium chauvoei</i> E <i>Clostridium septicum</i>	39
4.1. PCR multiplex para detecção de <i>Clostridium chauvoei</i> e <i>Clostridium septicum</i> em culturas puras.....	40
RESUMO	40
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAIS E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CAPÍTULO 4.....	45
5. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>Clostridium septicum</i>	45
5.1. Seqüenciamento e análise filogenética de seqüências parciais do gene da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> de isolados de campo e sementes vacinais do Brasil.....	46
RESUMO	46
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAIS E MÉTODOS	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS		Pág.
CAPÍTULO 2		
Tabela 1	Lista dos 33 casos de mionecroses em bovinos e suínos e os resultados dos clostrídios identificados pela técnica de estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) nos diferentes órgãos examinados desses casos (1936-2003)	37
CAPÍTULO 3		
Tabela 1	Lista dos isolados avaliados de acordo com a fonte, espécie e quantidade	43
CAPÍTULO 4		
Tabela 1	Isolados de <i>Clostridium septicum</i> utilizados para seqüenciamento	47
Tabela 2	Seqüências de nucleotídeos do gene da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> disponíveis no GenBank	48
Tabela 3	Número e tipo de substituições de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) em seqüências parciais do gene da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> em relação ao consenso	63
LISTA DE FIGURAS		
CAPÍTULO 1		
Surto de gangrena gasosa em bovinos		
Figura 1	Músculo da área de vacinação apresentando grandes áreas irregulares de coloração vermelho-enebrecidas	21
Surto de mionecroses em ovinos por <i>Clostridium chauvoei</i> após vacinação contra linfadenite caseosa		
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose da PCR de <i>Clostridium chauvoei</i>	26
CAPÍTULO 3		
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose da PCR multiplex de <i>Clostridium chauvoei</i> e <i>Clostridium septicum</i>	44
CAPÍTULO 4		
Figura 1	Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos (nt) de amostras de <i>Clostridium septicum</i> disponíveis no GenBank e dos isolados seqüenciados, comparadas à seqüência consenso	49
Figura 2	Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos (aa) de amostras de <i>Clostridium septicum</i> disponíveis no GenBank e dos isolados seqüenciados, comparadas à seqüência consenso	59
Figura 3	Análise filogenética de seqüências parciais de nucleotídeos (nt) do gene da toxina alfa de <i>Clostridium septicum</i> . Método de construção Neighbor-Joining, 1000 bootstrap	63

RESUMO

Realizaram-se estudos de casos de mionecroses causados por *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* e *Clostridium sordellii*, utilizando diferentes métodos laboratoriais. Fez-se estudo retrospectivo, empregando o complexo imunoenzimático estreptavidina-biotina peroxidase, em amostras clínicas parafinizadas de 33 casos de bovinos e suínos com suspeita clínica de mionecroses. Padronizou-se uma técnica de PCR multiplex para detecção de *C. chauvoei* e *C. septicum* e, realizaram-se seqüenciamento e análise filogenética de cinco isolados de campo e quatro sementes vacinais de *C. septicum*. No estudo retrospectivo, detectaram-se: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. chauvoei* mais *C. septicum*, *C. chauvoei* mais *Clostridium novyi* tipo A e *C. chauvoei* mais *C. sordellii* em 21, oito, dois, um e um casos, respectivamente. A técnica de PCR multiplex amplificou eficientemente seqüências gênicas de *C. chauvoei* e *C. septicum*, apresentando sensibilidade de 45pg/μL e 30pg/μL, respectivamente. Não foram observadas reações cruzadas com outras espécies de clostrídios, outras espécies bacterianas e, entre ambos os agentes. Pelo seqüenciamento e análise filogenética, observou-se a existência de dois diferentes grupos de *C. septicum*.

Palavras-chave: mionecroses, estudo retrospectivo, PCR multiplex, seqüenciamento, análise filogenética.

ABSTRACT

A study of natural cases of myonecroses by *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* was performed. In addition, a retrospective study employing the streptavidin-biotin peroxidase technique was made on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 33 field cases from cattle and swine suspected of myonecrosis. A multiplex PCR technique for the detection of *C. chauvoei* and *C. septicum* was standardized, and sequencing and phylogenetic analyses of five isolates and four vaccine strains of *C. septicum* was made. The results of the retrospective study revealed the presence of *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. chauvoei* plus *C. septicum*, *C. chauvoei* plus *Clostridium novyi* type A and *C. chauvoei* plus *C. sordellii* in 21, eight, two, one and one cases, respectively. The multiplex PCR technique showed to be efficient for amplifying genomic sequences of *C. chauvoei* and *C. septicum* isolates, presenting a sensitivity of 45pg/μL and 30pg/μL, respectively. No cross reactions were observed to other *Clostridia*, other bacterial species or between both agents. By the sequencing and phylogenetic analyses, the existence of two different genotypic groups of *C. septicum* was determined.

Key-words: myonecrosis, retrospective study, multiplex PCR, sequencing, phylogenetic analysis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As clostridioses compreendem o grupo de infecções e intoxicações freqüentemente fatais, causadas por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*. Nesse grupo, as mionecroses representadas pelo carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa, resultam da multiplicação e produção de toxinas por bactérias desse gênero, geralmente na musculatura e tecido subcutâneo dos ruminantes e outras espécies animais, com conseqüente lesão local e toxemia. O carbúnculo sintomático tendo como agente etiológico *Clostridium chauvoei*, nos bovinos é considerado uma doença "endógena" e nos ovinos é freqüentemente de origem exógena. Em contraste a gangrena gasosa, é uma infecção "exógena" podendo ser causada por *Clostridium septicum*, *C. chauvoei*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A (Lobato e Assis, 2000).

Os prejuízos econômicos advindos das mionecroses são difíceis de serem avaliados, em razão da escassez de dados disponíveis, entretanto, devido à alta letalidade estima-se que sejam altos. Dentre as clostridioses, as mionecroses são ainda as que acarretam maiores perdas para os pecuaristas no Brasil. Durante o período de 1970-1979, em 2082 materiais suspeitos de mionecroses enviados ao Instituto Biológico de São Paulo, foram encontrados 10,45% de amostras positivas para *C. chauvoei* e *C. septicum* (Baldassi et al., 1985). Em Minas Gerais, o carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa atingiram o maior índice de mortalidade entre as doenças infecciosas de bovinos nos anos de 1982 a 1986, o terceiro maior índice em 1987 e o segundo de 1988 a 1989 (Brasil, 1982-1989). No mesmo Estado, entre janeiro de 1990 a agosto de 2004, foram registrados de acordo com o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 14895 casos de

mionecroses (Solange Olinda, comunicação pessoal)¹.

Apesar do número de animais afetados ser elevado, a maioria dos diagnósticos são baseados apenas em dados clínicos e/ou lesões de necropsia, não sendo determinada a etiologia dos agentes envolvidos.

Existem no país poucos trabalhos sobre o diagnóstico etiológico das mionecroses, e esses diagnósticos foram feitos por meio de isolamento, caracterização morfológica e provas bioquímicas. Correa et al. (1980), isolaram *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* (sem relato do tipo) e *C. perfringens* atuando em associação com *C. sordellii*. Entretanto, *C. chauvoei* e *C. septicum*, apresentam alta similaridade nas reações bioquímicas e em meio sólido, *C. chauvoei* pode ter seu crescimento inibido pelo *C. septicum*, daí a importância das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), imunohistoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR), que apresentam maior rapidez e podem apresentar maior acurácia quando comparadas ao isolamento.

No Brasil são produzidas em torno de 140 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, sendo a maior parte delas com múltiplos antígenos. Existem vacinas que em uma única dose são administrados até nove diferentes tipos de bacterinas e/ou toxóides. A utilização de vacinas com múltiplos antígenos é desejável, mas devem ser eficientes e conterem em sua composição os antígenos dos agentes mais prevalentes no nosso meio, considerando que quanto mais antígenos se agrega a cada vacina mais onerosa ela se torna. Algumas vacinas produzidas no Brasil, quando avaliadas nos testes de potência não tiveram eficiência comprovada. Dias (2003) e Lobato et al. (2004) ao avaliarem a potência de vacinas contra *C. septicum* e *C.*

¹ Solange Olinda. Comunicação pessoal 2004 (Serviço de Sanidade Animal –SSA/DFA/MG), Minas Gerais, Brasil.

sordellii, respectivamente, verificaram que a grande maioria das vacinas testadas não foram eficientes. Além disso, somente as bacterinas para *C. chauvoei* e toxóides botulínicos C e D, são sistematicamente controladas por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Quanto à ocorrência das mionecroses, pouco se conhece sobre a distribuição dos agentes nas diversas regiões do país, em razão da baixa frequência de diagnósticos laboratoriais realizados.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo, realizar diagnóstico laboratorial de casos clínicos no período; fazer um estudo retrospectivo das mionecroses no Brasil; padronizar uma PCR multiplex para detecção de *C. chauvoei* e *C. septicum*, e realizar um estudo molecular comparando seqüências parciais de nucleotídeos e aminoácidos do gene que codifica a toxina alfa de *C. septicum*.

CAPÍTULO 1

2. IDENTIFICAÇÃO DE *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* E *Clostridium sordellii* EM CASOS CLÍNICOS

2.1. Surto de gangrena gasosa em bovinos

RESUMO

Este relato descreve um surto de gangrena gasosa em bovinos em Itacarambi, Minas Gerais, Brasil, resultando em alta mortalidade. Em um rebanho de 500 bovinos da raça Nelore com idade variando entre 14 a 18 meses, morreram 58 animais (11,6%), 30 dias após terem sido vacinados contra doenças clostridiais, raiva e febre aftosa. *Clostridium septicum* foi isolado em cultura pura e detectado pela técnica de imunofluorescência direta em impressões de músculo da área de vacinação e fígado dos quatro animais necropsiados.

Palavras-chave: bovinos, gangrena gasosa, *Clostridium septicum*, imunofluorescência direta

ABSTRACT

This report describes an outbreak of gas gangrene in cattle in Itacarambi, Minas Gerais, Brazil, resulting in high mortality. In a herd of 500 Nelore calves of ages varying between 14 and 18 months, 58 animals (11.6%) died 30 days after having been vaccinated against clostridial diseases, rabies and foot and mouth disease. *Clostridium septicum* was isolated in pure culture and was detected by fluorescent antibody testing in the muscle smears from the vaccination area and in the liver of four necropsied animals.

Key-words: cattle, gas gangrene, *Clostridium septicum*, fluorescent antibody technique

INTRODUÇÃO

O carbúnculo sintomático e a gangrena gasosa são clostridioses altamente fatais causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, que afetam geralmente a musculatura e tecido subcutâneo de ruminantes e outras espécies animais (Sterne e Batty, 1975).

O carbúnculo sintomático é uma infecção "endógena" causado por *Clostridium chauvoei* (Gyles, 1993). Em contraste, a gangrena gasosa é considerada uma infecção "exógena" produzida por ou mais dos seguintes microrganismos: *Clostridium septicum*, *C. chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium sordellii* e *Clostridium perfringens* tipo A (Sterne e Batty, 1975). Esses microrganismos entram no corpo dos animais através de feridas na pele ou membranas mucosas decorrentes de castrações, tosquiadas, sangrias e partos (Smith, 1984, Morris et al., 2002a).

Em várias partes do mundo, *C. septicum* é o principal agente responsável pela gangrena gasosa em bovinos. No Brasil, ambos *C. septicum* e *C. chauvoei*, atuando isoladamente ou em associação, são os agentes mais freqüentemente relatados como causadores de gangrena gasosa (Baldassi et al., 1985). Em Minas Gerais, segundo o Serviço de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foram registrados no período de janeiro de 1990 a agosto de 2004, 14.895 casos de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa (Solange Olinda, comunicação pessoal). Entretanto, apesar do grande número de casos, o diagnóstico etiológico das mionecroses no Brasil, é escasso (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985), sendo a maioria, baseados somente nos achados clínicos e de necropsia.

Este trabalho tem por objetivo, relatar um surto de gangrena gasosa em bovinos em Itacarambi, Minas Gerais, Brasil, relacionado à prévia vacinação contra clostridioses e outras doenças.

MATERIAL E MÉTODOS

Em um lote de 500 bovinos da raça Nelore de 14-18 meses de idade vivendo sob condições extensivas, morreram 58 animais (11,6%), com sinais clínicos sugestivos de mionecroses. Os animais foram vacinados contra clostridioses com uma vacina contendo *C. septicum* dentre outros clostrídios aos 4-6 meses de idade. Trinta dias antes do surto, receberam um *booster* contra clostridioses com outra vacina contendo *C. septicum*, bem como foram vacinados contra raiva e febre aftosa. O anti-parasitário cipermetrina na apresentação *pour-on*, foi também administrado no dorso dos animais no mesmo dia da vacinação. As vacinas foram aplicadas na região cervical por via subcutânea, empregando uma agulha inicialmente estéril para cada 40 animais. Não foi feita desinfecção da pele do sítio vacinal. As vacinas contra clostridioses e raiva continham como adjuvantes, hidróxido de alumínio e a vacina contra febre aftosa, adjuvante oleoso. Antes da morte, os animais apresentaram dificuldades para caminhar, depressão e recumbência. A maioria morreu em um período de 24 horas após o início dos sinais clínicos e poucos sobreviveram até três dias.

Quatro animais foram necropsiados aproximadamente cinco horas após a morte por um veterinário de campo. Amostras do músculo da área da vacinação (MAV), fígado, coração e pulmão foram assepticamente colhidas e submetidas sob refrigeração ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram assepticamente cultivadas em ágar sangue e em caldo Tioglicolato (Barcelona, Dignolab, Espanha) e incubadas em atmosfera de anaerobiose a 37°C por 48 horas. Impressões desses espécimes clínicos foram coradas pelo Gram e por uma técnica de imunofluorescência direta (IFD) conforme Assis et al. (2001), usando conjugados anti-*C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. sordellii*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A.

Amostras de referência desses clostrídios foram usadas como controle na técnica de IFD. Amostras adicionais do MAV foram assepticamente maceradas e inoculadas em cobaias (*Cavia porcellus*) por via intramuscular conforme Shapton e Board (1971). Os animais foram observados por dois dias e ao apresentarem sinais clínicos, foram necropsiados. Amostras do músculo da área de inoculação e fígado foram obtidas e processadas como descrito para os bovinos. Amostras das vacinas foram submetidas ao Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LARA), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil para testes de esterilidade e inocuidade (Brasil, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

À necropsia, todos os bovinos apresentaram grandes áreas irregulares de coloração vermelho-enebrecidas no MAV (Fig. 1). Foram também observadas, hemorragias sub-epicardiais e congestões pulmonares e hepáticas. Bastonetes Gram positivos,

pleomórficos, esporulados ou não, identificados como *C. septicum* pela IFD foram vistos a partir das impressões do MAV e fígado. Cada conjugado corou apenas a amostra correspondente. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de esfregaços de cultivo do MAV e fígado em ágar sangue quando corados pelo Gram e IFD. As cobaias apresentaram sinais clínicos 14-18 horas após a inoculação, consistindo de depressão e aumento de volume do sítio de inoculação dos macerados. Esta área estava quente, crepitante e de coloração violácea. À necropsia, severo edema muscular e subcutâneo foram observados. Bastonetes grandes, Gram positivos, pleomórficos, esporulados ou não, foram visualizados a partir de impressões dos espécimes clínicos desses animais. Profusa cultura pura de *C. septicum* foi obtida a partir do cultivo do músculo da área de inoculação em ágar sangue.

As vacinas foram consideradas estéreis e inócuas.

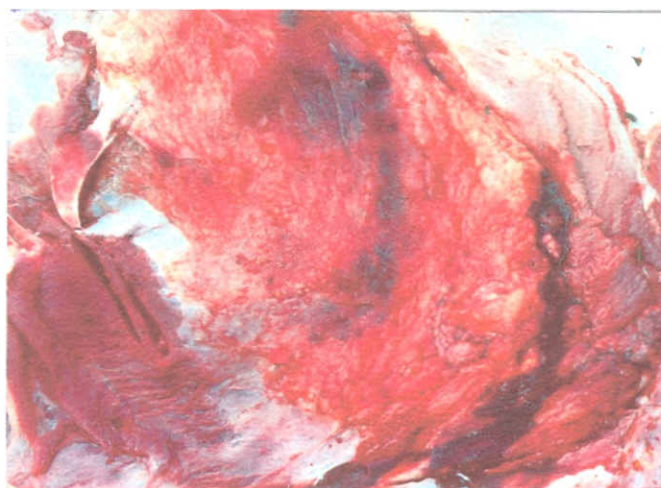


Figura 1. Músculo da área de vacinação apresentando grandes áreas irregulares de coloração vermelho-enebrecidas.

Com base nos achados patológicos e microbiológicos, permitiu-se firmar o diagnóstico de gangrena gasosa por *C. septicum*. IFD em impressões de tecidos, é considerada suficiente para o definitivo diagnóstico das mionecroses (Sterne e Batty, 1975).

De acordo com a história do caso, as únicas feridas que ocorreram nos animais acometidos, foram as vacinações realizadas 30 dias antes do surto. Isto é surpreendente, pois usualmente o período de incubação da gangrena gasosa é de 1-3 dias (Smith, 1984). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de outras injúrias nesses animais e que não foram detectadas durante o exame *post-mortem*.

É provável que o adjuvante oleoso da vacina contra febre aftosa tenha protegido os esporos do agente, formando um granuloma asséptico e condições de anaerobiose ocorreram somente 30 dias após o *booster* vacinal. Tem sido demonstrado que esporos de várias espécies de clostrídios apresentam um aumento da resistência no meio ambiente, quando suspensos em óleo (Ababouch e Busta, 1987). A maioria dos adjuvantes oleosos das vacinas são irritantes (Harwood, 1984), gerando granulomas crônicos no sítio vacinal. Harwood (1984) relatou quatro incidentes separados de mionecroses em bovinos devido à injeção de várias drogas não antibióticas e relatou que a natureza irritante de muitas preparações usadas comumente poderão também produzir acentuadas irritações locais.

É provável que *C. septicum* ou esporos do agente estavam presentes na pele dos animais e/ou meio ambiente, e foram admitidos para o interior dos tecidos muscular e subcutâneo dos mesmos durante o procedimento vacinal. Morris et al. (2002a), relataram um caso de gangrena gasosa em ovinos, no qual o fator predisponente para a ocorrência da doença nos animais, foi a sangria de rotina realizada na veia jugular para exame de brucelose. Os microrganismos envolvidos foram suspeitos de estarem no meio ambiente ou na pele da região da veia jugular.

Os animais deste estudo foram vacinados contra *C. septicum*; a presença do agente na infecção, poderia estar relacionada a um procedimento vacinal inadequado, a falta de resposta imune individual, a uma alta carga de esporos no meio ambiente, e/ou à pobre qualidade das vacinas empregadas. No Brasil, somente vacinas para *C. chauvoei* e *Clostridium botulinum* tipos C e D, são sistematicamente controladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; em Porto Alegre, Rio Grande do Sul e Pedro Leopoldo, Minas Gerais, respectivamente, e os demais antígenos são deixados a cargo dos Laboratórios fabricantes.

Este relato reforça a necessidade de se ter estritas medidas de higiene durante procedimentos que geram feridas, de um cuidadoso manejo dos animais para evitar traumas e uma apropriada vacinação para prevenção da gangrena gasosa.

2.2. Surto de mionecroses em ovinos por *Clostridium chauvoei* após vacinação contra linfadenite caseosa

RESUMO

Este relato descreve um surto de mionecroses em ovinos em Santa Terezinha, Bahia, Brasil, resultando em alta mortalidade. Em um rebanho de 500 ovinos da raça Santa Inês de 10-12 meses de idade vivendo em condições extensivas, morreram 58 animais (11%) entre 12 a 96 horas após serem vacinados contra linfadenite caseosa. Os mesmos não foram vacinados contra clostridioses. *Clostridium chauvoei* foi isolado em cultura pura, bem como foi identificado por uma técnica de imunofluorescência direta e também por uma técnica de PCR específica para este microrganismo a partir dos espécimes clínicos avaliados. As prováveis causas do surto, são discutidas.

Palavras-chave: ovinos, mionecroses, *Clostridium chauvoei*, imunofluorescência direta, PCR

ABSTRACT

This report describes an outbreak of clostridial myonecrosis in sheep in Santa Terezinha, Bahia, Brazil, resulting in high mortality. In a flock of 500, 10-12-month old Santa Inês sheep kept under extensive grazing conditions, 58 animals (11%) died 12 to 96 hours after being vaccinated against caseous lymphadenitis. The animals had never been vaccinated against clostridial diseases. *Clostridium chauvoei* was isolated in pure culture and identified by a fluorescent antibody technique and by a PCR technique specific for this microorganism. The probable causes (pathogenesis) of the outbreak are discussed.

Key-words: sheep, myonecrosis, *Clostridium chauvoei*, fluorescent antibody technique, PCR

INTRODUÇÃO

Carbúnculo sintomático e gangrena gasosa são doenças de bovinos, ovinos e outras espécies animais, conhecidas como mionecroses.

Carbúnculo sintomático, produzido por *C. chauvoei*, é uma condição freqüentemente descrita em bovinos (Sippel, 1972; Sterne e Batty, 1975; Williams, 1977; Harwood, 1984; Smith, 1984; Blood et al., 1989; Hateway, 1990; Sojka et al., 1992; Kuhnert et al., 1997), e é considerada uma doença "endógena", porque esporos do microrganismo estão latentes na musculatura de animais saudáveis e germinam quando "traumas" seguidos por anaerobiose tecidual ocorre (Gyles, 1993). Em contraste, em ovinos esta infecção é usualmente "exógena", decorrente de feridas na pele, as quais permitem o acesso deste microrganismo para o interior dos tecidos a partir do meio ambiente (Buxton e Donachie, 1991). Entretanto, carbúnculo sintomático em ovinos por *C. chauvoei* sem qualquer evidência de feridas, tem sido relatado envolvendo o músculo esquelético (Marsh et al., 1928) e o miocárdio (Glastonbury et al., 1988). Outra importante infecção exógena é referida como gangrena gasosa, enfermidade que pode acometer bovinos, ovinos e outras espécies animais por um ou mais dos seguintes microrganismos: *C. chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A (Sterne e Batty, 1975). Casos de gangrena gasosa por *C. chauvoei* em ovinos têm sido relatados após infecção de feridas decorrentes de brigas, tosquiadas, castrações, vacinações, intervenções cirúrgicas e contaminações do umbigo ao nascimento (Roberts e McEwen, 1931; Sterne, 1981; Lewis, 1999).

Apesar do grande número de casos de mionecroses em bovinos relatados anualmente no Brasil (Solange Olinda, comunicação pessoal, 2004), não existe nenhum relato dessas enfermidades em ovinos no Brasil. Também, a maioria dos diagnósticos das mionecroses em bovinos

no Brasil são baseados apenas em achados clínicos e de necropsia, e a informação etiológica sobre essas doenças é escassa (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985).

Este trabalho tem como objetivo, relatar um surto de mionecroses em ovinos por *C. chauvoei* em Santa Terezinha, Bahia, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Em um rebanho de 500 ovinos da raça Santa Inês de 10-12 meses de idade vivendo sob condições extensivas, morreram 58 animais (11%) 12 a 96 horas após serem vacinados contra linfadenite caseosa. Os mesmos não foram vacinados contra clostridioses. Os animais foram vacinados na coxa direita por via subcutânea sem desinfecção da pele e sem troca de agulha entre os animais. A maioria dos animais foram encontrados mortos, e naqueles em que sinais clínicos foram observados (19 animais), apresentaram laminite, aumento de volume da perna direita, perda de apetite, redução dos movimentos ruminais, aumento das freqüências cardíaca e respiratória, e severa depressão. Necropsia foi realizada imediatamente após a morte em um desses animais. Amostras de tecido subcutâneo e fígado foram assepticamente colhidas e submetidas sob refrigeração ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram assepticamente semeadas em ágar sangue e incubadas em atmosferas de aerobiose e anaerobiose a 37°C por 48 horas. Impressões desses tecidos foram coradas pelo Gram e examinadas por uma técnica de imunofluorescência direta (IFD) para *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* tipo A, *C. sordellii* e *C. perfringens* tipo A conforme Assis et al. (2001). Amostras de referência desses clostrídios foram usadas como controle na técnica de IFD. Culturas puras obtidas em anaerobiose foram processadas por uma técnica de PCR específica para a sub-unidade 16S rRNA de *C. chauvoei* (Uzal et al., 2003a). Amostra da vacina contra linfadenite caseosa usada no rebanho foi submetida para o Laboratório

Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura (LARA), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil para testes de esterilidade e inocuidade (Brasil, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

À necropsia, observou-se edema gelatinoso subcutâneo e congestão da cabeça, pescoço, tórax e da perna direita. Bastonetes Gram positivos, pleomórficos, esporulados ou não, identificados como *C.*

chauvoei pela IFD foram vistos a partir das impressões do tecido subcutâneo e fígado. Cada conjugado corou apenas a amostra correspondente. Cultura pura de bastonetes Gram positivos com a mesma morfologia descrita anteriormente foi obtida quando as amostras de tecido subcutâneo e fígado foram incubadas anaerobicamente. Colônias desses isolados foram também identificadas como pertencentes ao *C. chauvoei* pela PCR (Fig. 1). Não houve crescimento em aerobiose. A vacina foi considerada estéril e inócua.



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Canaleta 1. Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Canaleta 2. Extrato de DNA de *Clostridium chauvoei* obtido a partir de cultura pura do tecido subcutâneo lesado. Canaletas 3, 4, 5 e 6: extrato de DNA de amostras de referência de *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A, respectivamente. Canaleta 7: controle positivo de *C. chauvoei* (ATCC 10092). Canaleta 8: controle negativo.

Com base nos achados patológicos e microbiológicos, permitiu-se firmar o diagnóstico de mionecroses por *C. chauvoei*. IFD em impressões de tecidos é considerada suficiente para o definitivo diagnóstico das mionecroses (Sterne e Batty, 1975). Em adição, a técnica de PCR confirmou que o agente isolado foi *C. chauvoei*.

É provável que *C. chauvoei* ou esporos do agente estavam presentes no ambiente e/ou

pele dos animais e foram admitidos para o interior do tecido subcutâneo dos mesmos durante o procedimento vacinal (patogênese exógena). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade que esporos do microrganismo estavam em latência nos tecidos dos animais afetados, e a vacinação tenha sido o fator predisponente para germinação dos mesmos, culminando com o desencadeamento do processo (patogênese endógena). Como não realizou-se exame microbiológico da pele dos animais

afetados, ou do tecido muscular e subcutâneo dos clinicamente sadios, a precisa patogênese deste surto permanece indeterminada. Smith (1984) sugeriu que a ocorrência de mionecroses em ovinos sem a evidência de feridas (forma endógena), poderia estar relacionada com solos altamente contaminados com esporos de *C. chauvoei*. Portanto, a investigação do solo

dessa área, é recomendada para clarificar essa suspeita.

Este relato reforça a necessidade de se ter estritas medidas de higiene durante procedimentos que geram feridas, de um cuidadoso manejo dos animais para evitar traumas e uma apropriada vacinação para prevenção das mionecroses.

2.3. Surto de gangrena gasosa em ovinos por *Clostridium sordellii* após vacinação contra clostridioses

RESUMO

Este relato descreve um surto de gangrena gasosa em ovinos em Pintadas, Bahia, Brasil, resultando em alta mortalidade. Em um rebanho de 1000 ovinos da raça Santa-Inês com idade variando entre 12 a 18 meses, morreram 63 animais (6,3%), no período de 24 horas a três dias após terem sido vacinados contra clostridioses. *Clostridium sordellii* foi isolado em cultura pura e detectado pela técnica de imunofluorescência direta em esfregaço de exsudato subcutâneo e, em impressões de tecido subcutâneo e fígado de um animal necropsiado.

Palavras-chave: ovinos, gangrena gasosa, *Clostridium sordellii*, imunofluorescência direta

ABSTRACT

This report describes an outbreak of gas gangrene in sheep in Pintadas, Bahia, Brazil, resulting in high mortality. In a herd of 1000 Santa-Inês sheep of ages varying between 12-18 months, 63 animals (6.3%) died in a period of 24 hours to three days after having been vaccinated against clostridiosis. *Clostridium sordellii* was isolated in pure culture and was detected by fluorescent antibody testing in exudate of subcutaneous tissue and in smears of subcutaneous tissue and liver of one necropsied animal.

Key-words: sheep, gas gangrene, *Clostridium sordellii*, fluorescent antibody technique

INTRODUÇÃO

Gangrena gasosa é considerada uma infecção 'exógena' causada por um ou mais dos seguintes microrganismos: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A (Sterne e Batty, 1975). Esses microrganismos entram no corpo dos animais através de feridas na pele ou membranas mucosas decorrentes de castrações, tosquiagens, sangrias, partos e vacinações (Smith, 1984; Morris et al., 2002a; Assis et al., 2002).

Este relato descreve um surto de gangrena gasosa em ovinos por *C. sordellii* após vacinação contra clostridioses em Pintadas, Bahia, Brasil. Na mesma região geográfica, recentemente foi relatado um surto de mionecroses em ovinos por *C. chauvoei* após vacinação contra linfadenite caseosa (Assis et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Um rebanho de 1000 ovinos da raça Santa-Lênês de 12-18 meses de idade vivendo sob condições extensivas, foi vacinado contra clostridioses na região cervical por via subcutânea, com uma vacina comercial contendo *C. sordellii*, *C. chauvoei*, *Clostridium novyi*, *C. septicum*, *Clostridium perfringens* tipos B, C e D e *Clostridium botulinum* tipos C e D adsorvidos em hidróxido de alumínio. Foi usada apenas uma agulha inicialmente estéril para todo o rebanho e não foi feita desinfecção do sítio vacinal. No período de 24 horas a três dias, morreram 63 animais apresentando severa depressão, dificuldades para se caminhar e aumento de volume na região da vacinação.

Um Médico Veterinário de campo foi requisitado para visitar a propriedade. Ao chegar, encontrou 15 animais com severo edema, depressão, laminite e crepitação na região da vacinação, os quais vieram a óbito após três horas. Imediatamente, realizou-se assepticamente, punção aspirativa do exsudato subcutâneo e foi feita necropsia em um animal. Amostras de tecido

subcutâneo afetado e fígado, juntamente com o exsudato foram remetidas sob refrigeração ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os espécimes clínicos foram assepticamente semeados em ágar sangue e em caldo Tioglicolato (Barcelona, Dignolab, Espanha) e incubados em atmosferas de aerobiose e anaerobiose a 37°C por 48 horas. Esfregaços do exsudato e impressões do tecido subcutâneo e fígado foram coradas pelo Gram e por uma técnica de imunofluorescência direta (IFD) para *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A, conforme Assis et al., 2001. Amostras de referência desses clostrídios foram usadas como controle na técnica de IFD. Amostra da vacina foi também submetida ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, para testes de esterilidade e inocuidade (Brasil, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

À necropsia, o animal apresentou extensivo edema, enfisema e hemorragia do tecido subcutâneo da área da vacinação. Observou-se também, um excesso de fluido pleural. Bastonetes Gram positivos, pleomórficos, esporulados (freqüentemente com esporos centrais) ou não esporulados, identificados como *C. sordellii* pela IFD foram vistos a partir de esfregaço do exsudato e impressões de tecido subcutâneo e fígado. Cada conjugado corou apenas a amostra correspondente. Cultura pura de bastonetes Gram positivos com a mesma morfologia descrita acima para o exsudato e impressões dos espécimes clínicos, foram obtidas a partir do cultivo do exsudato, tecido subcutâneo e fígado em ágar sangue, em anaerobiose. Não ocorreu crescimento em condições de aerobiose. As colônias apresentavam aproximadamente 3-7 mm de diâmetro, crenadas e com margens tentaculares. Profuso crescimento foi observado no caldo Tioglicolato. Cultura pura de colônias idênticas àquelas isoladas diretamente do ágar sangue foram obtidas a partir do subcultivo dos espécimes clínicos

em caldo Tioglicolato e ágar sangue, em anaerobiose. As colônias foram certificadas tratarem-se de *C. sordellii* por meio de testes bioquímicos (Quinn et al., 1994).

A vacina foi considerada estéril e inócua.

Com base nos achados patológicos e microbiológicos, permitiu-se firmar o diagnóstico de gangrena gasosa por *C. sordellii*.

Doenças devido ao *C. sordellii* em ovinos, têm sido associadas com enterites (Al-Mashat e Taylor, 1983) e mortes súbitas (Lewis e Naylor, 1998). *C. sordellii* foi isolado juntamente com *C. novyi* tipo A em um caso de gangrena gasosa em ovinos, devido à sangria de rotina para brucelose realizada na veia jugular (Morris et al., 2002a). Este parece ser o segundo relato no mundo de *C. sordellii* causando gangrena gasosa em ovinos atuando isoladamente. Em ovinos, esta condição foi anteriormente descrita por Vannelli et al. (1996) na Argentina; constituindo-se, portanto, na primeira descrição desta condição no Brasil. Tal condição foi também relatada na espécie bovina por Williams (1977) na Inglaterra. *C. sordellii*, foi anteriormente diagnosticado no Brasil a partir de casos de gangrena gasosa em associação ao *C.*

perfringens (sem relato do tipo) por Correa et al. (1980).

É provável que *C. sordellii* ou esporos do agente estavam presentes na pele dos animais e/ou meio ambiente, e foram admitidos para o interior do tecido subcutâneo dos mesmos durante o procedimento vacinal.

Devido ao fato que outros casos de mionecroses ocorreram previamente na mesma região do presente surto (Assis et al., 2004), é provável que o solo dessa área, seja altamente infectado com esporos desses clostrídios e, futura investigação do mesmo, é sugerida para melhor clarificar esse ponto.

Em recente trabalho realizado por Lobato et al. (2004), avaliando a potência de vacinas contra *C. sordellii*, verificou-se que a maioria das mesmas foram ineficientes. Este fator, também pode ter contribuído para a ocorrência de gangrena gasosa por *C. sordellii* nesses animais.

Este relato reforça a necessidade de se ter estritas medidas de higiene durante procedimentos que geram feridas, bem como de uma apropriada vacinação para prevenção da gangrena gasosa.

CAPÍTULO 2

3. ESTUDO RETROSPECTIVO DE MIONECROSES EM AMOSTRAS CLÍNICAS PARAFINIZADAS

3.1. Estudo retrospectivo de mionecroses em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina por uma técnica de estreptavidina-biotina peroxidase

RESUMO

Com o objetivo de se determinar a ocorrência dos diferentes agentes envolvidos nas mionecroses no Brasil, neste trabalho foi realizado um estudo retrospectivo a partir de 33 casos suspeitos de carbúnculo sintomático e/ou gangrena gasosa pela técnica de estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) em tecidos de bovinos e suínos fixados em formol e incluídos em parafina pertencentes a arquivos de patologia de diferentes Estados do país. Pela SBP, os clostrídios mais detectados foram: *Clostridium chauvoei* (21 casos ou 63,6%), seguidos pelo *Clostridium septicum* (oito casos ou 24,2%), *C. chauvoei* mais *C. septicum* (dois casos ou 6%), *C. chauvoei* mais *Clostridium sordellii* (um caso ou 3%) e *C. chauvoei* mais *Clostridium novyi* tipo A (um caso ou 3%). Este é o primeiro diagnóstico de *C. novyi* tipo A no Brasil, e os achados da maior ocorrência de *C. chauvoei* e *C. septicum*, corroboram com estudos anteriores no país. Também, neste trabalho pela primeira vez no Brasil, relata-se a ocorrência de *C. chauvoei* associado à lesão no miocárdio. O achado de *C. septicum* nos três casos de suínos, corrobora com as prévias descrições da literatura, segundo a mesma, o agente é o mais comum em casos de mionecroses nessa espécie. Além disso, este estudo fornece importantes dados sobre a ocorrência dos agentes responsáveis pelas mionecroses em diferentes Estados do país, os quais são importantes para decisões relativas à produção de vacinas contra essas doenças. Entretanto, para esse objetivo final, mais materiais devem ser examinados pela SBP a partir de todas regiões do Brasil para se determinar a real prevalência dessas doenças.

Palavras chave: estudo retrospectivo, clostrídios, mionecroses, estreptavidina-biotina peroxidase

ABSTRACT

In order to determine the occurrence of the different agents involved in the pictures of clostridial myonecroses of Brazil, a retrospective study from 33 cases suspected of blackleg and/or gas gangrene was conducted using a streptavidin-biotin peroxidase technique (SBPT) on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and swine from different states of the country. By the SBPT, the *Clostridia* most predominantly detected were *Clostridium chauvoei* (21 cases or 63.6%) and *Clostridium septicum* (eight cases or 24.2%). These two microorganisms were also found in association in two cases (6%). *C. chauvoei* was still found in association with *Clostridium sordellii* (one case or 3 %) and with *Clostridium novyi* type A (one case or 3%). This is the first diagnostic of *C. novyi* type A in Brazil, and the findings of the higher occurrence of *C. chauvoei* and *C. septicum*, agree with previous works in Brazil. Also by the first time in Brazil, is reported the occurrence of *C. chauvoei* associated with lesion in the myocardium. The findings of *C. septicum* in the three cases of swine corroborates with previous descriptions in literature, in which it was demonstrated that this is the most common agent involved in cases of clostridial myonecrosis in this animal species. In spite of the small number of samples examined, this study supplies important data about the agents responsible for clostridial myonecrosis in different states of Brazil. This information is specially important for decisions relative to the production of vaccines against these diseases. However, for this final objective, more materials must be examined by the SBPT from all regions of Brazil to determine the real prevalence of these diseases.

Key words: retrospective study, clostridia, myonecrosis, streptavidin-biotin peroxidase technique

INTRODUÇÃO

Mionecroses, representadas pelo carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, são enfermidades altamente fatais para ruminantes e outras espécies animais (Sterne e Batty, 1975). O carbúnculo sintomático é considerado uma doença "endógena" para bovinos e na maioria dos casos, "exógena" para ovinos. Em ambas espécies, é determinado por *Clostridium chauvoei*. Em contraste, a gangrena gasosa é uma doença "exógena" causada por um ou mais dos seguintes microrganismos: *C. chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A (Sterne e Batty, 1975). Em várias partes do mundo, *C. chauvoei* e *C. septicum* são considerados os agentes mais comumente responsáveis pelas mionecroses (Pinto e Abreu, 1992). No Brasil, ambos *C. chauvoei* e *C. septicum*, atuando isoladamente ou combinação, são os mais freqüentemente encontrados nos casos de mionecroses (Baldassi et al., 1985). Em Minas Gerais, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2004, foram registrados 14.895 casos de mionecroses (Solange Olinda, comunicação pessoal). Entretanto, apesar do grande número de casos, a maioria dos diagnósticos são feitos apenas com base nos achados clínicos e de necropsia (Assis et al., 2001), e a informação etiológica é escassa (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985). Esta informação tem sido baseada somente no isolamento, características morfológicas e provas bioquímicas. Entretanto, *C. chauvoei* e *C. septicum*, apresentam alta similaridade com base nesses caracteres e, *C. chauvoei* pode ter seu crescimento superado por *C. septicum* em meio sólido. Outros entraves estão relacionados com as dificuldades para obtenção, envio e processamento dos espécimes clínicos no laboratório (Assis et al., 2001). Para resolver parte desses problemas, recentemente Assis et al., 2005, desenvolveram uma técnica de imunohistoquímica empregando o complexo imunoenzimático estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) para detecção dos agentes envolvidos nas mionecroses em amostras clínicas parafinizadas.

Para se determinar a etiologia dos agentes envolvidos nos quadros de mionecroses no Brasil, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo retrospectivo em 33 casos de bovinos e suínos suspeitos de mionecroses pertencentes a diferentes arquivos de patologia do país pela técnica de SBP.

MATERIAL E MÉTODOS

Detalhes sobre os casos estudados estão demonstrados na Tab.1. Trinta e três casos e, desses, 53 órgãos suspeitos de mionecroses com base em achados de necropsia, foram disponíveis. A maioria dos casos, não apresentaram uma completa história. Informação sobre o intervalo de tempo decorrido entre a morte e a necropsia, foi disponível somente de sete casos. Informação sobre sinais clínicos e ectoscopia, não foi fornecida de nenhum dos casos, o que seria de grande valia para se prognosticar os casos avaliados. Informação sobre condições *post mortem* dos diferentes órgãos avaliados, foi fornecida somente dos provenientes do Estado de Minas Gerais (MG). Também, a partir de cada caso, somente alguns órgãos foram disponibilizados. Apesar do músculo esquelético, ser o principal espécime clínico utilizado no diagnóstico laboratorial das mionecroses, previamente (Assis et al., 2005), detectaram pela SBP, *C. chauvoei* e *C. septicum* em outros órgãos e não apenas no músculo esquelético de cobaias (*Cavia porcellus*) infectadas experimentalmente com esses microrganismos. De acordo com esse achado, os autores sugeriram a avaliação de outros órgãos e, não somente o músculo esquelético para o diagnóstico laboratorial das mionecroses. Neste estudo, a partir dos 33 casos, músculo esquelético foi disponibilizado e naqueles em que havia outros órgãos, com base nos achados prévios de Assis et al., 2005, foram também selecionados: coração, fígado, baço e rim. Os materiais desse estudo foram avaliados pela técnica de SBP conforme Assis et al., 2005, usando anticorpos policlonais produzidos em coelhos para a específica detecção de *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. novyi* tipo A em amostras

clínicas parafinizadas. As secções avaliadas pela técnica foram previamente montadas em Silane (Sigma, St. Louis, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos clostrídios identificados pela SBP nos 33 casos de mionecroses em bovinos e suínos com seus respectivos 53 órgãos estão apresentadas na Tab.1.

De acordo com os resultados obtidos (Tab. 1), detectou-se *C. chauvoei* em 21 casos (63,6%), *C. septicum* em oito (24,2%), *C. chauvoei* mais *C. septicum* em dois (6%), *C. chauvoei* mais *C. sordellii* em um caso (3%) e, *C. chauvoei* mais *C. novyi* tipo A em um caso (3%). Os achados da maior ocorrência de *C. chauvoei* e *C. septicum*, corroboram com as prévias descrições no Brasil (Correa et al., 1980, Baldassi et al., 1985), e por Williams (1977), na Inglaterra. O trabalho de Williams (1977), é o único semelhante a este na literatura. O autor examinou 173 casos de mionecroses de bovinos apenas a partir do músculo esquelético pela técnica de imunofluorescência direta (IFD). Neste estudo, o padrão de distribuição e as quantidades dos clostrídios detectados nos diferentes órgãos examinados pela técnica de SBP (Tab.1), foram semelhantes às prévias descrições de Assis et al. (2005). Apesar da baixa ocorrência, o achado de *C. sordellii* e *C. novyi* tipo A é surpreendente. O caso referente a *C. sordellii* (14299), o mesmo foi detectado no músculo esquelético em associação ao *C. chauvoei*. A necropsia foi realizada 18 horas após a morte. Apesar dos agentes envolvidos nas mionecroses estarem presentes no trato-intestinal dos animais domésticos (Gyles, 1993), e invadirem a carcaça logo após a morte, principalmente *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A (Sterne e Batty, 1975), acredita-se que esse caso foi devido a esses agentes em associação, já que segundo o histórico, o músculo esquelético apresentava em boas condições e bastonetes desses microrganismos foram detectados em grandes números pela técnica de SBP. Contaminações *post mortem*, podem ter ocorrido nos dois casos envolvendo *chauvoei* mais *C. septicum* (8563 e 8571), em virtude da ausência de

informações sobre o tempo decorrido entre a morte e necropsia. Entretanto, acredita-se que esses casos foram devido a esses agentes em associação, pois segundo os históricos, os órgãos examinados apresentavam em boas condições e, bastonetes desses agentes foram detectados em grandes números no músculo esquelético, médias quantidades no fígado, e pequenas quantidades no baço e rim. Os achados de *C. chauvoei* e *C. septicum* em outros órgãos e não somente no músculo esquelético (casos 8563, 8273, 17447, 439, 185, 316, 329, 21, 235, 20194, 9764, 8571, 1811 e 688), têm sido relatados anteriormente (Assis et al., 2005). Esses achados em parte confirmam que outros órgãos podem também ser usados na rotina do diagnóstico laboratorial das mionecroses pela técnica de SBP previamente padronizada por Assis et al. (2005), porque a partir da maioria desses casos, informação sobre o intervalo decorrido entre a morte e necropsia não foi fornecida (exceto casos 1811 e 8273), e, portanto, não se pode descartar a possibilidade de ter ocorrido contaminações *post mortem*. Apesar da ausência dessa informação, acredita-se que esses casos foram devidos a esses agentes, pois segundo os históricos, os órgãos estavam em boas condições; exceção para os provenientes dos estados do Rio Grande do Sul (RS), Rio de Janeiro (RJ), Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), e, a partir da grande maioria, o músculo esquelético foi também examinado (exceção dos casos 688, 17447 e 20194), e nesses tecidos musculares esqueléticos, bastonetes desses microrganismos foram detectados em grandes números pela técnica de SBP (Tab. 1).

Nos demais 16 casos envolvendo *C. chauvoei* e *C. septicum* detectados separadamente e restritos apenas ao músculo esquelético (Tab. 1), apesar da ausência de informação sobre o intervalo decorrido entre a morte e necropsia, acredita-se que foram devidos a esses agentes, porque de acordo com a maioria dos históricos, os tecidos estavam em boas condições; exceção para os casos: 229-RS, 1974, 2158 e 2390-RJ, N140-00 e 187-00-

MT e 03R-B-MS, e, bastonetes desses microrganismos foram detectados em grandes números pela técnica de SBP (Tab.1).

O achado de *C. chauvoei* nos casos 235, 329 e 17447 envolvendo lesão no miocárdio, caracteriza o carbúnculo sintomático visceral. Essa forma de apresentação da doença é raramente descrita na América do Sul e em todo mundo. Uzal et al. (2003b), relataram um surto em bezerros na Patagônia, Argentina. Informação sobre o intervalo decorrido entre a morte e necropsia e, sobre as condições *post mortem* dos materiais, não foram fornecidas a partir dos casos (235 e 329) e, a partir do caso 17447, não foi fornecida informação sobre o intervalo decorrido entre a morte e necropsia, mas segundo o histórico, o órgão apresentava boas condições. Esses casos encontrados neste estudo, parecem ser os primeiros no Brasil.

O achado de *C. novyi* tipo A no caso 9844, consiste no primeiro diagnóstico do agente no Brasil. De acordo com a história do caso, o animal foi necropsiado três horas após a morte e, bastonetes do agente foram detectados em grandes números pela SBP (Tab.1). Em adição, este parece ser o primeiro relato na literatura da associação entre *C. chauvoei* e *C. novyi* tipo A em bovinos, embora essa condição foi descrita por Morris et al. (2002b) em ovinos. O achado de *C. chauvoei* associado ao *C. sordellii*, parece ser o primeiro na literatura. Recentemente no país, *C. sordellii* foi o agente responsável por um surto de gangrena gasosa em ovinos (Costa et al., 2005), entretanto somente material "fresco" foi remetido para diagnóstico laboratorial, e o mesmo foi isolado em cultura pura, bem como detectado pela IFD conforme Assis et al. (2001), porém o microrganismo já havia sido anteriormente diagnosticado no Brasil em associação ao *C. perfringens* (sem relato do tipo) por Correa et al. (1980) a partir de casos de gangrena gasosa. Neste trabalho, o achado de *C. septicum* nos três casos de suínos, corrobora com prévias descrições da literatura. Segundo Bergeland (1981), o agente é o mais comumente envolvido nos quadros de mionecroses

nessa espécie, e *C. chauvoei* é raramente encontrado.

Este parece ser o primeiro estudo de mionecroses pela técnica de SBP em amostras clínicas parafinizadas. Deve-se chamar atenção para a eficiência da técnica de SBP empregada neste trabalho no qual os 33 casos e seus respectivos 53 órgãos suspeitos de tratarem-se de mionecroses com base em achados de necropsia, foram todos certificados tratarem-se de mionecroses, bem como, a etiologia dos mesmos, foi determinada.

Um importante aspecto relacionado diretamente com este trabalho, diz respeito às vacinas clostridiais nacionais. No Brasil, são vendidas a cada ano, aproximadamente 140 milhões de doses de vacinas contra clostridioses. A maioria delas são polivalentes, contendo ao redor de quatro a nove antígenos. Entretanto, o grande entrave, é que apenas bacterinas contra *C. chauvoei* e toxóides para *C. botulinum* tipos C e D, são sistematicamente controladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Porto Alegre, Rio Grande do Sul e Pedro Leopoldo, Minas Gerais, respectivamente, e o controle de qualidade dos demais componentes antigênicos, são deixados a cargo dos laboratórios produtores. Trabalho realizado por Dias (2003) avaliando vacinas contra *C. septicum* e por Lobato et al. (2004) avaliando vacinas contra *C. sordellii*, demonstraram que a maioria das mesmas foram ineficientes. Desse modo, além do problema relacionado com a potência das vacinas, muito dos componentes antigênicos correntemente presentes nas formulações, como exemplo *C. sordellii*, foi detectado em apenas um caso neste estudo. Isso pode ter sido devido ao fato que a maioria dos diagnósticos das mionecroses são clínicos e, portanto, poucos materiais são encaminhados para diagnóstico laboratorial. Entretanto, apesar da baixa casuística estudada (33 casos), os resultados indicam que *C. chauvoei* e *C. septicum* são os mais frequentes nos casos de mionecroses, corroborando com estudos prévios realizados no Brasil (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985) e na Inglaterra (Williams, 1977) e, *C. sordellii* e *C. novyi* tipo

A, foram detectados em um caso cada. O achado da baixa ocorrência de *C. sordellii* e *C. novyi* tipo A neste estudo, leva-se a refletir sobre a necessidade de manutenção de *C. sordellii* presente na maioria das vacinas comerciais e para a inclusão de *C. novyi* tipo A, já que nenhuma das vacinas nacionais contém esse agente. Para serem tomadas decisões relativas à composição antigênica das vacinas clostridiais nacionais, só será possível a partir da obtenção da real prevalência dos agentes causadores das mionecroses em nosso meio, informação que ainda não é conhecida. Portanto, mais materiais deverão ser examinados pela técnica de SBP a partir de todas os Estados do Brasil. Com base nessa informação, as indústrias poderão reavaliarem a composição antigênica das vacinas e por sua vez, essa informação reflete diretamente nos produtores rurais, pois quanto mais antígenos se agrega a uma vacina, mais onerosa ela se torna para o mesmo. Assim, com uma maior escala de diagnósticos, as indústrias poderão passar a colocar nas vacinas, apenas os componentes antigênicos dos agentes mais prevalentes em cada Estado do país.

Outro importante achado deste estudo está relacionado com os materiais examinados.

Conforme observado, verificou-se que muitos desses materiais eram muito antigos desde a década de 30 até os dias atuais (Tab.1). Gimeno (1995), relatou que quando diferentes técnicas de imuno-histoquímica fossem utilizadas em amostras clínicas parafinizadas muito antigas, como as deste estudo, poderia ocorrer a formação de "cross links" nesses materiais, sendo necessário recorrer-se a diferentes técnicas de recuperação antigênica. Neste trabalho, é provável que esse procedimento laboratorial não foi necessário em razão dos "cross links" caso presentes, não terem sido suficientes para interferirem com a eficiência da técnica de SBP, aliado à qualidade dos anticorpos primários empregados, como previamente demonstrado por Assis et al. (2005).

É pertinente frizar mais uma vez que a maioria dos diagnósticos das mionecroses no Brasil são baseados apenas em dados clínicos e de necropsia, e a frequência de diagnósticos laboratoriais é muito baixa. Esse fato foi claramente demonstrado neste estudo, no qual verificou-se que a partir de um longo período de tempo (1936-2003), apenas 33 casos foram disponíveis para avaliação pela técnica de SBP.

Tabela 1. Lista dos 33 casos de mionecroses em bovinos e suínos e os resultados dos clostrídios identificados pela técnica de estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) nos diferentes órgãos examinados desses casos (1936-2003)

Caso	Órgão	Espécie/Idade/Intervalo Morte-Necropsia	Estado-Ano	Resultados da SBP	Localização do Antígeno
7	músculo esquel.	bovino/*NF/*NF	MG-1936	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
266	músculo esquel.	bovino/*NF/*NF	MG-1940	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
688	baço	bovino /*NF/*NF	MG-1942	<i>C. chauvoei</i> (+1)	interst. da polpa vermelha
1480	músculo esquel.	bovino/1 ano/*NF	MG-1947	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
1811	músculo esquel.	Bovino/3 anos/ 3 horas	MG-1949	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
1811	baço	Bovino/3 anos/ 3 horas	MG-1949	<i>C. chauvoei</i> (+1)	interst. da polpa vermelha
3999	músculo esquel.	bovino /*NF/*NF	MG-1958	<i>C. septicum</i> (+5)	interstício
8571	músculo esquel.	bovino/1 ano/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+5) mais <i>C. septicum</i> (+5)	interstício
8571	figado	bovino/1 ano/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+3) mais <i>C. septicum</i> (+3)	interst. periácinar
8273	músculo esquel.	bovino/5meses/ 3 horas	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
8273	figado	bovino/ 5 meses/ 3horas	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+3)	interst. periácinar e vasos portais
8273	baço	bovino/ 5 meses/ 3horas	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+1)	interst. da polpa vermelha
8563	músculo esquel.	bovino/4 anos/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+5) mais <i>C. septicum</i> (+5)	interstício
8563	figado	bovino/4 anos/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+3) mais <i>C. septicum</i> (+3)	interst. periácinar e vasos portais
8563	baço	bovino/4anos/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+1) mais <i>C. septicum</i> (+1)	interst. da polpa vermelha
8563	rim	bovino/4 anos/*NF	MG-1967	<i>C. chauvoei</i> (+1) mais <i>C. septicum</i> (+1)	interst. córtex renal
9418	músculo esquel.	Suíno/*NF/ 3 horas	MG-1968	<i>C. septicum</i> (+5)	interstício
9764	músculo esquel.	bovino/8 meses/*NS	MG-1969	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
9764	rim	bovino/8 meses/*NS	MG-1969	<i>C. chauvoei</i> (+1)	interst. córtex renal
9844	músculo esquel.	bovino/6 meses/ 3 horas	MG-1969	<i>C. chauvoei</i> (+5) mais <i>C. novyi</i> tipo A (+5)	interstício
14299	músculo esquel.	bovino/4-5 meses/ 18horas	MG-1974	<i>C. chauvoei</i> (+5) mais <i>C. sordellii</i> (+5)	interstício
1974	músculo esquel.	bovino /8meses/*NF	RJ-1979	<i>C. chauvoei</i> (+5)	interstício
17447	miocárdio	Bovino/15 meses/ *NF	MG-1980	<i>C. chauvoei</i> (+3)	interstício

continuação

Caso	Órgão	Espécie/Idade/Intervalo Morte-Necropsia	Estado-Ano	Resultados da SBP	Localização do Antígeno
17447	figado	bovino/15 meses/*NF	MG-1980	C. chauvoei (+3)	interst. periácinar e vasos portais
17447	baço	bovino/15 meses/*NF	MG-1980	C. chauvoei (+1)	interst. da polpa vermelha
2158	músculo esquel.	bovino/1ano/*NF	RJ-1980	C. chauvoei (+5)	interstício
2390	músculo esquel.	bovino/6meses/*NF	RJ-1980	C. chauvoei (+5)	interstício
20194	figado	bovino/*NF/*NF	MG-1989	C. chauvoei (+3)	Interst. periácinar
20194	baço	bovino/*NF/*NF	MG-1989	C. chauvoei (+1)	Interst. da polpa vermelha
86	músculo esquel.	bovino/*NF/*NF	MG-1999	C. chauvoei (+5)	interstício
185	músculo esquel.	bovino/10 meses/*NS	MG-1999	C. chauvoei (+5)	interstício
185	figado	bovino/10 meses/*NS	MG-1999	C. chauvoei (+3)	interst. periácinar
222	músculo esquel.	bovino/1ano/*NF	MG-1999	C. chauvoei (+5)	interstício
439	músculo esquel.	bovino/7 meses/*NF	MG-2001	C. septicum (+5)	interstício
439	figado	bovino/7 meses/*NF	MG-2001	C. septicum (+3)	interst. periácinar
439	baço	bovino/7 meses/*NF	MG-2001	C. septicum (+1)	interst. da polpa vermelha
439	rim	bovino/7 meses/*NF	MG-2001	C. septicum (+1)	interst. do córtex renal
195	músculo esquel.	suíno/4 dias/2 horas	RS-2002	C. septicum (+5)	interstício
196	músculo esquel.	suíno/4 dias/2 horas	RS-2002	C. septicum (+5)	interstício
21	músculo esquel.	bovino/8 meses/*NF	RS-2003	C. chauvoei (+5)	interstício
21	figado	bovino/8 meses/*NF	RS-2003	C. chauvoei (+3)	interst. periácinar
229	músculo esquel.	bovino/3 anos/*NF	RS-2003	C. chauvoei (+5)	interstício
235	músculo esquel.	bovino/7 meses/*NF	RS-2003	C. chauvoei (+5)	interstício
235	miocárdio	bovino/7 meses/*NF	RS-2003	C. chauvoei (+3)	interstício
316	músculo esquel.	bovino/*NF/*NF	RS-*NF	C. septicum (+5)	interstício
316	figado	bovino/*NF/*NF	RS-*NF	C. septicum (+3)	interst. periácinar
329	músculo esquel.	bovino/*NF/*NF	RS-*NF	C. chauvoei (+5)	interstício
329	miocárdio	bovino/*NF/*NF	RS-*NF	C. chauvoei (+3)	interstício
2546	músculo esquel.	Bovino/*NF/*NF	MG-*NS	C. septicum (+5)	interstício
N140-00	músculo esquel.	Bovino/*NF/*NF	MT-*NS	C. chauvoei (+5)	interstício
187-00	músculo esquel.	Bovino/*NF/*NF	MT-*NS	C. septicum (+5)	interstício
03R-B	músculo esquel.	Bovino/*NF/*NF	MS-*NS	C. septicum (+5)	interstício

*NF= não fornecido +5= alta quantidade de bastonetes +3= média quantidade de bastonetes +1= pequena quantidade de bastonetes

CAPÍTULO 3

4. PCR PARA DETECÇÃO DE *Clostridium chauvoei* E *Clostridium septicum*

4.1. PCR multiplex para detecção de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* em culturas puras

RESUMO

Padronizou-se uma técnica de PCR multiplex para detecção do gene que codifica a flagelina de *C. chauvoei*, e o gene que codifica a toxina alfa de *C. septicum* em culturas puras. Em cada reação, foram empregados um par de iniciadores para um segmento específico do gene que codifica a flagelina e um par para um segmento específico do gene que codifica a toxina alfa, produzindo um produto de 516 pb e 270 pb de *C. chauvoei* e *C. septicum*, respectivamente. DNA genômico de amostras de referência de ambos microrganismos foram usadas como controle. A PCR multiplex foi avaliada testando, 16 culturas puras de *C. chauvoei* provenientes de ruminantes, 15 culturas puras de *C. septicum* provenientes de ruminantes, e quatro sementes vacinais de cada um desses agentes. Para avaliar a especificidade, DNAs genômicos dos seguintes microrganismos foram usados: *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium botulinum* tipo D, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*. Todos os isolados e sementes vacinais de *C. chauvoei* e *C. septicum* foram positivos pela técnica, e não foram observadas reações cruzadas com as outras espécies de clostrídios, outras espécies bacterianas ou entre ambos agentes. As menores concentrações de DNA de *C. chauvoei* e *C. septicum* detectados, foram 45 pg/μL e 30 pg/μL, respectivamente. A PCR multiplex usada neste estudo foi eficiente para a específica identificação de *C. chauvoei* e *C. septicum* em culturas puras.

Palavras-chave: PCR multiplex, detecção, *Clostridium chauvoei*, gene flagelina, *Clostridium septicum*, gene toxina alfa.

ABSTRACT

A multiplex PCR was standardized to detect the gene that codes for the flagellin of *C. chauvoei*, and the gene that codes the alpha toxin of *C. septicum*, in pure cultures. In each reaction, a pair of primers for a specific segment of flagellin gene and a pair of primers for a specific segment of alpha toxin gene were employed, producing an amplicon of 516 bp and 270 bp of *C. chauvoei* and *C. septicum*, respectively. Genomic DNA of reference strains of both microorganisms was used as control. The multiplex PCR was evaluated by testing 16 clinical isolates of *C. chauvoei* from ruminants, 15 clinical isolates of *C. septicum* from ruminants, and four vaccine strains of each one of these agents. To evaluate the specificity, genomic DNA of the following microorganisms were used: *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* type A, *Clostridium perfringens* type A, *Clostridium novyi* type B, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium botulinum* type D, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella tiphymurium*. All the isolates and vaccine strains of *C. chauvoei* and *C. septicum* were positive by this technique and no cross reactions were observed with other species of clostridia, with other bacterial species or between both agents. The smallest concentrations of DNA of *C. chauvoei* and *C. septicum* detected were 45 pg/μL and 30 pg/μL, respectively. The multiplex PCR used here was useful for the specific identification of *C. chauvoei* and *C. septicum* in pure cultures.

Key-words: multiplex PCR, detection, *Clostridium chauvoei*, flagellin gene, *Clostridium septicum*, alpha toxin gene.

INTRODUÇÃO

Clostridium chauvoei e *Clostridium septicum* são responsáveis pelas mionecroses, (carbúnculo sintomático e gangrena gasosa), clostridioses altamente fatais que geralmente afetam a musculatura e tecido subcutâneo de ruminantes e outras espécies animais.

Em várias partes do mundo, *C. chauvoei* e *C. septicum* são considerados os principais agentes responsáveis pelas mionecroses (Pinto e Abreu, 1992). No Brasil, ambos microrganismos, atuando isoladamente ou em associação, são os mais freqüentemente relatados nos casos de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa em bovinos (Baldassi et al., 1985). Apesar do grande número de casos de mionecroses no Brasil, a informação etiológica sobre essas doenças é escassa (Correa et al., 1980; Baldassi et al., 1985). A maioria dos diagnósticos são baseados apenas em achados clínicos e de necropsia (Assis et al., 2001).

A PCR multiplex apresenta-se vantajosa porque em apenas uma reação, é possível detectar ambos *C. chauvoei* e *C. septicum*, os quais podem ser encontrados em associação nos quadros de mionecroses nas diferentes espécies animais (Williams, 1977; Poonacha et al., 1982; Harwood, 1984).

Neste estudo, uma técnica de PCR multiplex foi padronizada para detectar o gene que codifica a flagelina de *C. chauvoei* e o gene que codifica a toxina alfa de *C. septicum* em culturas puras.

MATERIAL E MÉTODOS

Os DNAs genômicos usados neste estudo foram obtidos a partir dos isolados listados na Tab.1. Após certificado crescimento e pureza pelo Gram, e adicionalmente a certificação da identidade dos isolados de *C. chauvoei* e *C. septicum* por uma técnica de imunofluorescência direta (Pinto e Abreu, 1992), os clostrídios foram subcultivados em

caldo cérebro-coração (Difco, Maryland, EUA) e incubados a 37°C em atmosfera de anaerobiose por 48 horas. As demais espécies bacterianas foram também subcultivadas em caldo cérebro-coração em aerobiose a 37°C por 24 horas. Após verificado crescimento e pureza pelo Gram, os isolados foram novamente subcultivados em 15 mL de caldo cérebro-coração e incubados como descrito acima. Finalmente, após verificado crescimento e pureza pelo Gram, os isolados foram processados para a extração de DNA genômico conforme a metodologia descrita por Takeuchi et al. (1997).

Para padronização da PCR multiplex, a técnica de PCR para detecção do gene da flagelina de *C. chauvoei* foi realizada conforme Kojima et al. (2001), e para detecção do gene da toxina alfa de *C. septicum*, segundo Takeuchi et al. (1997). Entretanto, modificações foram feitas em ambas técnicas. Kojima et al. (2001), usaram 1µL de DNA genômico de cada microrganismo testado (portanto não determinaram a concentração prévia de DNA usado) e empregaram 2 minutos de extensão a 72°C. Takeuchi et al. (1997), usaram 10µg de DNA genômico, e 2,5mM de dNTPs para todos microrganismos avaliados, e não relataram o uso de um ciclo inicial de desnaturação e de um ciclo final de extensão a 72°C. Para determinação das concentrações de DNA dos microrganismos usados neste estudo, alíquotas dos mesmos foram dosadas em espectrofotômetro (Thermo Spectronic Model Genesys 10UV, Rochester, NY, EUA) a 260-280nm de absorvância ($A_{260-280}$), e finalmente determinadas conforme Sambrook et al. (1989). Todos ensaios de PCR foram realizados no termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, Milford, EUA). Para padronização da PCR multiplex neste estudo, foram empregados 35 ciclos, sendo um ciclo inicial de desnaturação a 94°C/5min, seguidos por 34 ciclos a 94°C por 1 minuto para desnaturação, 54°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Foi também incluído, um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os

seguintes pares de iniciadores foram usados: *C. chauvoei*- 516-senso (5' ATCGGAAACATGAGTGCTGC 3') e 516-anti-senso (5' AGTCTTTATGCTTCCGCTAG 3') (Kojima et al., 2001) e *C. septicum*: senso- (5' AATTCAGTGTGCGGCAGTAG 3') e anti-senso- (5' CCTGCCCCAACTTCTCTTTT 3') (Takeuchi et al., 1997). Usando esses iniciadores, os produtos esperados foram de 516 pb e 270 pb, respectivamente. A PCR foi realizada em um volume final de 100µL, usando 2,5mM de MgCl₂ (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), 10 pmol de cada iniciador de *C. chauvoei*, 20 pmol de cada iniciador de *C. septicum* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,25mM de dNTPs (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 2,5U de *Taq* polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), e 450ng e 300ng de DNA genômico de *C. chauvoei* e *C. septicum*, respectivamente. Para avaliar a especificidade dos iniciadores para detecção de *C. chauvoei* e *C. septicum*, DNAs genômicos das demais espécies de clostrídios, bem como das outras cinco espécies bacterianas (Tab. 1), foram testadas nas mesmas condições descritas acima, com exceção para o uso de 450ng de DNA de cada um desses microrganismos. Também, em duas reações do multiplex conforme descrito acima, foram utilizados DNAs genômicos de *C. chauvoei* e *C. septicum* separadamente para verificação da especificidade dos iniciadores entre esses agentes. Em todas reações de *C. chauvoei* e *C. septicum*, controles positivo e negativo desses agentes foram processados. Como controle positivo de *C. chauvoei*, foi usado DNA genômico da amostra ATCC 10092 e para *C. septicum*, DNA genômico da amostra ATCC 12464.

Como controle negativo, foram utilizados todos os reagentes da PCR sem os DNAs genômicos.

Após PCR, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil), foi usado como marcador de peso molecular. Apesar de neste estudo terem sido empregados iniciadores já publicados (Takeuchi et al., 1997; Kojima et al., 2001); para certificação da identidade dos produtos amplificados de *C. chauvoei* e *C. septicum*, DNA de uma semente de *C. chauvoei* usada na produção de vacinas e do isolado de *C. septicum* Itaperuna proveniente do Estado do Rio de Janeiro (RJ), respectivamente (Tab. 1), foram novamente amplificados conforme acima, e as respectivas bandas correspondentes ao *C. chauvoei* e *C. septicum*, foram cortadas do gel com auxílio de um bisturi estéril e purificadas separadamente usando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System A9281 (Promega, Wisconsin, EUA) conforme recomendações do fabricante e os DNAs, submetidos para seqüenciamento no Bioagro/UFV/Minas Gerais.

Para se determinar a menor concentração de DNA de *C. chauvoei* e *C. septicum* detectado pela técnica, a partir de concentrações de 450ng/µL e 300ng/µL de DNA genômico das amostras ATCC 10092 e ATCC 12464 de *C. chauvoei* e *C. septicum*, respectivamente, foram realizadas para cada um desses DNAs, diluições decimais (10⁻¹ a 10⁻⁶).

Tabela.1. Lista dos isolados avaliados de acordo com a fonte, espécie e quantidade.

Isolados	Fonte	Número de isolados
<i>Clostridium chauvoei</i>	Estado do Mato Grosso do Sul –bovino	2
	Estado do Espírito Santo –bovino	1
	Estado do Rio de Janeiro –bovino	3
	Estado da Bahia –ovino	1
	Estado do Rio Grande do Sul-bovino	4
	Estado de Minas Gerais-bovino	2
	Estado de São Paulo-bovino	2
	SEO ¹ 19798- bovino	1
	Vacinal ²	4
<i>Clostridium septicum</i>	ATCC ³ 10092 (controle positivo)	
	Estado do Rio de Janeiro-bovino	6
	Estado do Rio Grande do Sul-bovino	4
	Estado de São Paulo-bovino	2
	SEO ¹ -19748-bovino	1
	SEO ¹ -1-bovino	1
	SEO ¹ 16-bovino	1
	Vacinal ²	4
	ATCC 12464 (controle positivo)	
<i>Clostridium sordellii</i>	ATCC 9714	1
<i>Clostridium novyi</i> tipo A	ATCC 19402	1
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	ATCC 3624	1
<i>Clostridium novyi</i> tipo B	ATCC 25758	1
<i>Clostridium haemolyticum</i>	ATCC 9650	1
<i>Clostridium botulinum</i> tipo D	NCTC ⁴ 8265	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	1
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
<i>Salmonela tiphymurium</i>	ATCC 14028	1

¹Sem Estado de Origem- Doadas pelo Instituto Biológico de São Paulo (IBSP)

²Sementes de quatro laboratórios brasileiros produtores de vacinas contra clostridioses.

³American Type Culture Collection

⁴National Collection of Type Cultures

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR multiplex foi padronizada com 20 isolados de *C. chauvoei* (16 culturas puras provenientes de ruminantes e quatro sementes usadas na produção de vacinas) e 19 de *C. septicum* (15 culturas puras provenientes de ruminantes e quatro sementes usadas na produção de vacinas). Todos os isolados clínicos desses agentes foram especificamente detectados pela PCR multiplex, no qual observou-se somente a amplificação dos produtos esperados de 516 pb e 270 pb de *C. chauvoei* e *C.*

septicum, respectivamente. Reações cruzadas não foram observadas com as demais espécies de clostrídios, outras espécies bacterianas e entre *C. chauvoei* e *C. septicum* (Fig.1). Em todas reações, os controles positivo e negativo de *C. chauvoei* e *C. septicum*, mostraram-se também eficientes. Os produtos amplificados e purificados de *C. chauvoei* e *C. septicum*, tiveram sua identidade certificada pelo seqüenciamento. A seqüência do isolado Itaperuna de *C. septicum*-RJ está disponível no GenBank sob o número de acesso AY589051.

Na figura 1, está demonstrada a amplificação de uma cultura pura de *C. chauvoei* do Estado de Minas Gerais e de uma cultura pura de *C. septicum* do Estado do Rio Grande do Sul. Em adição, está representada a amplificação desses

isolados, usando os respectivos DNAs genômicos, separadamente. Também, são mostrados os resultados da PCR multiplex, usando DNAs genômicos de *C. sordellii*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A.

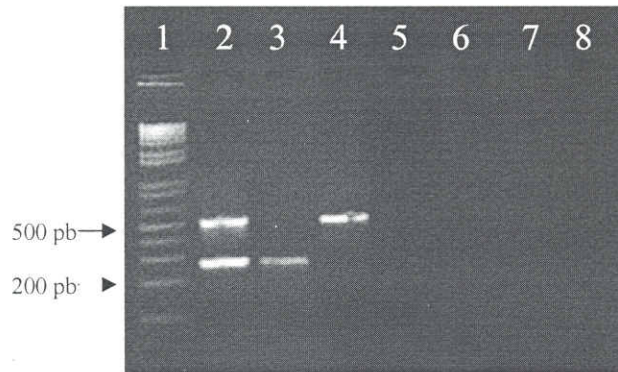


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose da PCR multiplex de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. Canaleta 1: marcador de peso molecular (1 kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Canaleta 2: amplificação de cultura pura de *C. chauvoei* (Estado de Minas Gerais) e cultura pura de *C. septicum* (Estado do Rio Grande do Sul). Amplificação de *C. septicum* (canaleta 3) e *C. chauvoei* (canaleta 4) usando DNA genômico desses agentes separadamente. Canaleta 5: DNA genômico de *Clostridium sordellii*. Canaleta 6: DNA genômico de *Clostridium novyi* tipo A. Canaleta 7: DNA genômico de *Clostridium perfringens* tipo A. Canaleta 8: controle negativo.

As menores concentrações de DNA detectados da amostra ATCC 10092 de *C. chauvoei* e da amostra ATCC 12464 de *C. septicum*; foram 45pg/ μ L e 30pg/ μ L, respectivamente.

Em relação aos prévios estudos (Takeuchi et al., 1997; Kojima et al., 2001), não possível realizar uma comparação da sensibilidade, devido às diferentes metodologias adotadas por esses autores. Takeuchi et al. (1997), determinaram a menor quantidade de DNA detectado por reação, em UFC/mL e Kojima et al. (2001), em UFC. Neste estudo, foi em picogramas.

Sasaki et al., 2002a,b, desenvolveram duas técnicas de PCR multiplex para detecção de *C. chauvoei*, *C. septicum* e outros clostrídios patogênicos com base no gene que codifica a flagelina desses microrganismos. Portanto, a técnica de PCR multiplex padronizada neste estudo, parece ser a primeira na literatura para detecção de *C. septicum*, baseando-se no gene da toxina alfa. A PCR multiplex mostrou-se também eficiente para detectar *C. chauvoei* e *C. septicum*, separadamente. Esta técnica complementar os procedimentos laboratoriais para o diagnóstico de *C. chauvoei* e *C. septicum*, podendo melhorar o diagnóstico das mionecroses no Brasil.

CAPÍTULO 4

5. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Clostridium septicum*

5.1. Seqüenciamento e análise filogenética de seqüências parciais do gene da toxina alfa de *Clostridium septicum* de isolados de campo e sementes vacinais do Brasil

RESUMO

Neste estudo realizou-se seqüenciamento e análise filogenética de seqüências parciais do gene que codifica a toxina alfa de isolados de campo e sementes vacinais de *Clostridium septicum* do Brasil, com o intuito de verificar se existem diferenças gênicas, bem como de aminoácidos entre elas. Avaliaram-se seqüências deste gene, bem como de aminoácidos de cinco isolados de campo de *C. septicum*, e quatro sementes utilizadas na produção de vacinas contra clostridioses. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que existem dois grupos de *C. septicum* no Brasil, tanto para isolados de campo, quanto para as utilizadas na produção de vacinais. O grupo 1 constitui a maioria das seqüências, tendo duas das sementes de vacinas e é bastante conservado. O grupo 2 apresenta seqüências com número significativo de mudanças nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, e outras duas sementes utilizadas para fabricação de vacinas no Brasil. Portanto, de acordo com este experimento, verificou-se haver diferenças gênicas, bem como de aminoácidos entre isolados de campo e vacinais.

Palavras chave: *Clostridium septicum*, toxina alfa, seqüenciamento, análise filogenética

ABSTRACT

In this study, sequencing and phylogenetic analysis of partial sequences of the gene that codes for alpha toxin of *Clostridium septicum* from field isolates and vaccine strains of Brazil were performed with the objective of verifying the existence of genic differences as well as differences in amino acid composition among these strains. Sequences of this gene, as well as of amino acids, from five field isolates of *C. septicum*, and four vaccine strains used in the production of vaccines against clostridiosis were evaluated. According to the results, it was verified that two groups of *C. septicum* exist in Brazil. Group 1 holds the majority of the sequences, including two vaccine strains, and is very conserved. Group 2, holds isolates with a significant number of changes in the sequences of nucleotides and amino acids, and the other two vaccine strains used in the production of vaccines in Brazil. This experiment showed that there are genetic differences, as well as differences of amino acid sequences among the Brazilian isolates of *C. septicum* studied.

Key-words: *Clostridium septicum*, alpha toxin, sequencing, phylogenetic analysis

INTRODUÇÃO

Clostridium septicum atuando isoladamente ou em associação ao *Clostridium chauvoei*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A, é causador da gangrena gasosa, infecção "exógena" altamente fatal para ruminantes e outras espécies animais que geralmente acomete a musculatura e tecido subcutâneo (Sterne e Batty, 1975). Esses microrganismos penetram através de feridas na pele ou membranas mucosas tais como: castração, tosquias, parto, procedimentos vacinais, punções venosas, entre outros (Smith, 1984). *C. septicum*, produz cinco toxinas, alfa (hemolítica, necrótica e letal), beta (DNase), gama (hialuronidase), delta (hemolisina), e uma neuraminidase (Hateway, 1990), sendo a toxina alfa, a mais importante na patogenia e segundo alguns autores, na imunogenicidade do agente (Ballard et al., 1992, Ballard et al., 1993, Amimoto et al., 2002). *C. septicum* é filogeneticamente semelhante ao *C. chauvoei*, apresentando 99,3% de

similaridade com base na sub-unidade 16S rRNA (Kuhnert et al., 1996). Esses agentes secretam as mesmas toxinas com semelhante espectro de ação (Gyles, 1993). Entretanto, Ballard et al., 1992, demonstraram que nenhuma proteína de *C. chauvoei* é antigenicamente relacionada à toxina alfa de *C. septicum*.

Neste trabalho realizou-se o seqüenciamento e análise filogenética de seqüências parciais do gene que codifica a toxina alfa de isolados de campo e sementes vacinais de *C. septicum* do Brasil, com o intuito de verificar se existem diferenças gênicas, bem como de aminoácidos entre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nesse estudo, cinco isolados de campo e quatro sementes de *C. septicum* usadas na produção de vacinas brasileiras. A caracterização dos isolados do microrganismo está representada na Tab.1.

Tabela 1. Isolados de *Clostridium septicum* utilizados para seqüenciamento.

Registro	Espécie	Idade	Material de isolamento	Estado/País
19748	bovina	bezerro	fígado	Guaratinguetá-SP/Brasil
16*	**NC	**NC	**NC	**NC/Brasil
421/355/98	bovina	10 meses	Medula óssea	Sto. Antônio de Pádua-RJ/ Brasil
421/701/97	bovina	18 meses	Medula óssea	Aperibé-RJ/ Brasil
421/250P/90	bovina	5 meses	Medula óssea	Itaperuna-RJ/ Brasil
L-1***				Brasil
L-2***				Brasil
L-3***				Brasil
L-4***				Brasil

* isolado cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo (IBSP)

** NC- não consta

*** sementes de *Clostridium septicum* provenientes de quatro laboratórios brasileiros produtores de vacinas contra clostridioses

Os isolados e sementes vacinais de *C. septicum* após identificados por uma técnica imunofluorescência direta (IFD) (Assis et al., 2001), foram subcultivados em caldo cérebro-coração (Difco, Maryland, EUA) e incubados a 37°C em anaerobiose por 48 horas. Após verificado crescimento e pureza

pela coloração de Gram, foram novamente subcultivados em 15 mL de caldo cérebro-coração e incubados como descrito acima. Em seguida, após certificado crescimento e pureza pelo Gram, foram processados para extração do DNA genômico conforme

metodologia descrita por Takeuchi et al. (1997).

Foram empregados os iniciadores senso e anti-senso descritos por Takeuchi et al. (1997). Esses iniciadores amplificam um produto específico do gene da toxina alfa de *C. septicum* de 270 pb e estão localizados na posição 611 a 880 da seqüência de nucleotídeos descrita por Imagawa et al. (1994).

A PCR foi realizada conforme Takeuchi et al. (1997), com exceção para o uso de 300ng de DNA, 0,25mM de dNTPs (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C/5 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C/7 minutos. Em todas as reações foram utilizados como controle positivo, DNA genômico da amostra ATCC 12464 e como controle negativo todos os reagentes da PCR, exceto DNA. As ampliações foram realizadas no termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, Milford, EUA).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% p/v em tampão TAE 1X (20,3 mM KH₂PO₄, 10,4 M Tris-acetato, 10mM EDTA pH 8,0), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A corrida eletroforética foi efetuada a 100V, com tempo médio de 40 minutos. Como padrão de tamanho molecular, utilizou-se o 1 Kb

Plus DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

DNAs dos isolados descritos na Tab. 1 foram novamente amplificados e purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System A9281 (Promega, Wisconsin, EUA) conforme recomendações do fabricante e enviados para seqüenciamento no Bioagro/UFV/Minas Gerais. De cada isolado foram feitos dois seqüenciamentos, um com cada iniciador.

Os cromatogramas do gene da toxina alfa dos isolados de *C. septicum* de campo e vacinais foram editados pelo programa Bioedit Sequence Alignment Editor versão 5.0.9 (Hall, 1999). Durante a edição, empregou-se como padrão de comparação a seqüência do gene da toxina alfa de *C. septicum* D17668 depositada no GenBank por Imagawa et al. (1994). A partir de seqüências do gene da toxina alfa de *C. septicum* disponíveis no GenBank (Tab. 2), foi obtida uma seqüência consenso, por meio do Bioedit. As seqüências dos isolados deste estudo após editadas, foram alinhadas com as seqüências do gene da toxina alfa de *C. septicum* disponíveis no GenBank e, comparadas à seqüência consenso para as análises de nucleotídeos (nt). Por fim, os alinhamentos de nt foram traduzidos à seqüências de aminoácidos (aa), também utilizando o programa Bioedit.

Tabela 2. Seqüências de nucleotídeos do gene da toxina alfa de *Clostridium septicum* disponíveis no GenBank.

Isolado	Número de acesso no GenBank	País	Tamanho da seqüência (nt)	Referência
NCTC547	D17668	Japão	2293	Imagawa et al. (1994)
Linhagem celular: 44	AB083433	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Kagoshima 8	AB083434	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Mie	AB083435	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Yamaguchi 6335	AB083436	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Kagoshima 1	AB083437	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Fukushima 5	AB083438	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
Linhagem celular: Tokachi	AB083439	Japão	1333	Y. Sasaki, não publicado
BX96	S75954	EUA	1542	Ballard et al. (1995)

A partir dos alinhamentos de nt, foram realizadas as análises filogenéticas. As análises foram feitas no programa MEGA versão 2.1 (Kumar et al., 2001). Utilizou-se o modelo de substituição de nt Kimura 2-P e o método de construção de árvores Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR amplificou fragmentos de 270 pb, que foram purificados e submetidos para seqüenciamento. Após edição, obteve-se seqüências de 248 nt e de 82 aa.

A seguir estão representados os alinhamentos com seqüências parciais de nt e aa do gene que codifica a toxina alfa de *C.*

septicum das seqüências brasileiras e disponíveis no GenBank, comparadas às seqüências consensos de nt e aa (Figs. 1 e 2). Observou-se que na posição 216, o programa Bioedit não originou consenso e, portanto, foram considerados para análises de nt, apenas 247 nt de cada seqüência. Não foram observadas deleções ou inserções nas seqüências avaliadas. Observaram-se 82 substituições de nt, sendo 61 dessas, substituições não silenciosas (74,4 %), o que levou a 39 trocas de aa. A maioria das substituições de nt foram do tipo transição (64,6 %) (Tab. 3). O número e tipo de substituições de nt e aa em seqüências parciais do gene da toxina alfa de *C. septicum*, em relação ao consenso, estão apresentados na Tab. 3.

	* 1	11	21	31	41
Consenso	GCAGTAGTAC	CACATGTACA	AGCTTATGCA	CTTACAAATC	TTGAAGAGGG
D17668	-----	-----	-----	-----	-----
AB083433	-----	-----	---C-----	-----T	-----
AB083434	-----	-----	---C-----	-----T	-----
AB083435	-----	-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	-----	-----	-----T	-----
AB083437	-----	-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----	-----	-----	-----
L-2	-----	-----	---C-----	-----T	-----
L-3	-----	-----	-----	-----	-----
L-4	-----	-----	---C-----	-----T	-----
16	-----	-----	-----	-----	-----
S.Antônio	-----	-----	-----	-----	-----
19748	-----	-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	-----	-----	-----T	-----
Itaperuna	-----	-----	-----	-----	-----

	51	61	71	81	91
Consenso	GGGATATGCA	AATCATAATA	ATGCTTCTTC	AATTAAAATA	TTTGGATATG
D17668	-----	-----	-----	-----	-----
AB083433	-----	---T---	-----	-----	-----
AB083434	-----	---T---	-----	-----	-----
AB083435	-----	-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	-----	-----	-----	-----
AB083437	-----	-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----	-----	-----	-----
L-2	-----	---T---	-----	-----	-----
L-3	-----	-----	-----	-----	-----
L-4	-----	---T---	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----	-----
S.Antônio	-----	-----	-----	-----	-----
19748	-----	-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	-----	-----	-----	-----
Itaperuna	-----	-----	-----	-----	-----

	101	111	121	131	141
Consenso	AAGACAATGA	AGATTTAAAA	GCTAAAATTA	TTCAAGATCC	AGAGTTTATA
D17668	-----	-----	-----	-----	-----
AB083433	-----	G-----	-----	-----	-----
AB083434	-----	G-----	-----	-----	-----
AB083435	-----	-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	-----	-----	-----	-----
AB083437	-----	-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----	-----	-----	-----
L-2	-----	G-----	-----	-----	-----
L-3	-----	-----	-----	-----	-----
L-4	-----	G-----	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----	-----
S.Antônio	-----	-----	-----	-----	-----
19748	-----	-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	-----	-----	-----	-----
Itaperuna	-----	-----	-----	-----	-----

	151	161	171	181	191
Consenso	AGAAATTGGG	CAAATGTAGC	TCATTCATTA	GGATTTGGAT	GGTGCGGTGG
D17668	-----	-----	-----	-----	-----
AB083433	-C--C--	-----	-----	-----	-----
AB083434	-C--C--	-----	-----	-----	-----
AB083435	-----	-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	-----	-----	-----	-----
AB083437	-----	-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----	-----	-----	-----
L-2	-C--C--	-----	-----	-----	-----
L-3	-----	-----	-----	-----	-----
L-4	-C--C--	-----	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----	-----
S.Antônio	-C--C--	-----	-----	-----	-----
19748	-----	-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	-----	-----	-----	-----
Itaperuna	-----	-----	-----	-----	-----

	201	211	221	231	241
Consenso	AACGGCTAAT	CCAAA-GTTG	GACAAGGTTT	TGAATTTAAA	AGAGAAGT
D17668	-----	-----T-----	-----	-----	-----
AB083433	---A---TTA	--TGGAA---	--G---AC--	-----	-----G--
AB083434	---A---TTA	--TGGAA---	--G---AC--	-----	-----
AB083435	-----	-----C-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	-----C-----	-----	-----	-----
AB083437	-----	-----C-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----C-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----T-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----C-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----T-----	-----	-----	-----
L-2	---A---TTA	--GGAA---	--G---AC--	-----	-----
L-3	-----	-----T-----	-----	-----	-----
L-4	---A---TTA	--TGGAA---	--G---C---	-----	-----
16	-----	-----T-----	-----	-----	-----
S. Antônio	---A---TTA	--TGGAA---	--G---AC--	-----	-----
19748	-----	-----C-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	-----C-----	-----	-----	-----
Itaperuna	-----	-----T-----	-----	-----	-----

*As seqüências de nt correspondem à posição 624-871 da seqüência D17668. Traços representam nt equivalentes aos da seqüência consenso.

Figura 1. Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos (nt) de amostras de *Clostridium septicum* disponíveis no GenBank e dos isolados seqüenciados, comparadas à seqüência consenso.

	*1	11	21	31	41
Consenso	AVVPHVQAYA	LTNLEEGGYA	NHNNASSIKI	FGYEDNEDLK	AKIIQDPEFI
D17668	-----	-----	-----	-----	-----
AB083433	-----	---F---	-Y-----	-----	-----
AB083434	-----	---F---	-Y-----	-----	-----
AB083435	-----	-----	-----	-----	-----
AB083436	-----	---F---	-----	-----	-----
AB083437	-----	-----	-----	-----	-----
AB083438	-----	-----	-----	-----	-----
AB083439	-----	-----	-----	-----	-----
S75954	-----	-----	-----	-----	-----
L-1	-----	-----	-----	-----	-----
L-2	-----	---F---	-Y-----	-----	-----
L-3	-----	-----	-----	-----	-----
L-4	-----	---F---	-Y-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----	-----
S.Antônio	-----	-----	-----	-----	-----
19748	-----	-----	-----	-----	-----
Aperibé	-----	---F---	-----	-----	-----
Itaperuna	-----	-----	-----	-----	-----

	51	61	71	81
Consenso	RN	WANVAHSL	GFGWCGGTAN	PNVGQGFEEK RE
D17668	-----	-----	-----	---
AB083433	T-----	-----	L -GI-ED----	---
AB083434	T-----	-----	L -GI-ED----	---
AB083435	-----	-----	-----	---
AB083436	-----	-----	-----	---
AB083437	-----	-----	-----	---
AB083438	-----	-----	-----	---
AB083439	-----	-----	-----	---
S75954	-----	-----	-----	---
L-1	-----	-----	-----	---
L-2	T-----	-----	L -GI-ED----	---
L-3	-----	-----	-----	---
L-4	T-----	-----	L -GI-E-----	---
16	-----	-----	-----	---
S.Antônio	T-----	-----	L -GI-ED----	---
19748	-----	-----	-----	---
Aperibé	-----	-----	-----	---
Itaperuna	-----	-----	-----	---

*Os aa correspondem aos aa da posição 22-103 da seqüência D17668. Traços representam aa equivalentes aos da seqüência consenso.

Figura 2. Alinhamento de seqüências parciais de aminoácidos (aa) de amostras de *Clostridium septicum* disponíveis no GenBank e dos isolados seqüenciados, comparadas à seqüência consenso.

Tabela 3. Número e tipo de substituições de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) em seqüências parciais do gene da toxina alfa de *Clostridium septicum* em relação ao consenso.

Seqüências	Nº de substituição (%)		Substituições silenciosas (%)	Tipo substituição nt	
	nt	aa		Transições	Transversões
D17668	0	0	0	0	0
S75954	0	0	0	0	0
AB043435	0	0	0	0	0
AB043437	0	0	0	0	0
AB043438	0	0	0	0	0
AB043439	0	0	0	0	0
L-1	0	0	0	0	0
L-3	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
19748	0	0	0	0	0
Itaperuna	0	0	0	0	0
AB083433	18 (7,3)	8 (9,8)	5 (27,7)	12	6
AB083434	17 (6,9)	8 (9,8)	4 (23,5)	11	6
AB083436	1 (0,4)	1 (1,2)	0	1	0
Aperibé	1 (0,4)	1 (1,2)	0	1	0
L-2	16 (6,5)	8 (9,8)	4 (25,0)	11	5
L-4	16 (6,5)	7 (8,5)	5 (31,2)	10	6
S. Antônio	13 (5,3)	6 (7,3)	3 (23,1)	7	6

A partir das análises filogenéticas, obteve-se o seguinte dendrograma (Fig.3).

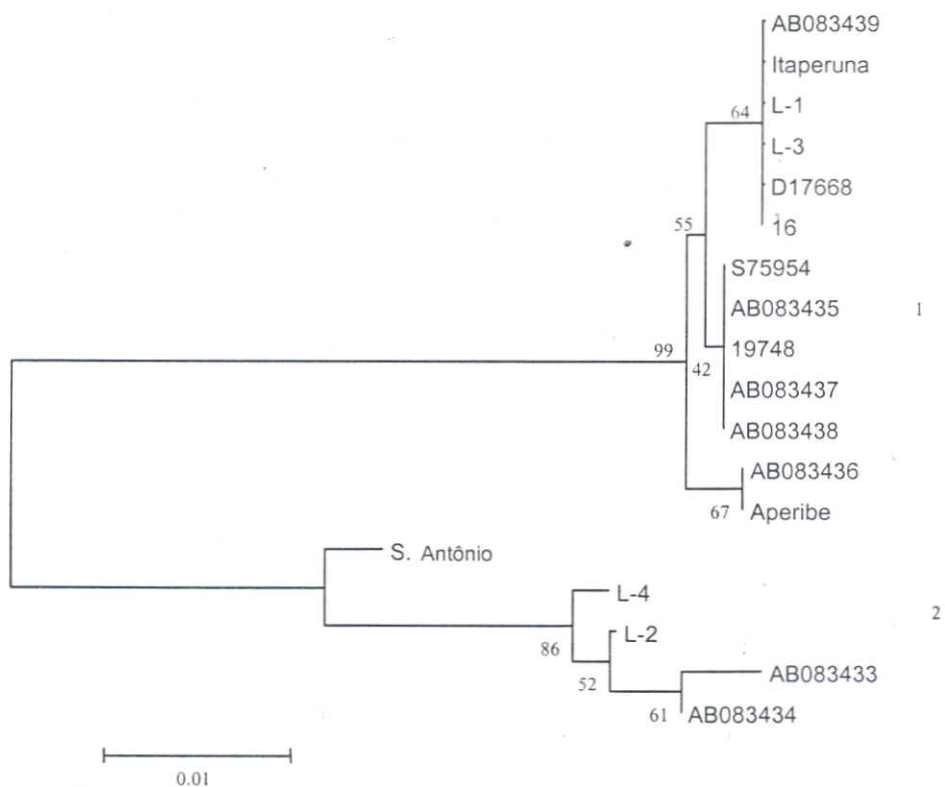


Figura 3. Análise filogenética de seqüências parciais de nucleotídeos (nt) do gene da toxina alfa de *Clostridium septicum*. Método de construção Neighbor-Joining, 1000 bootstrap.

Na época em que o estudo foi planejado, existiam apenas duas seqüências disponíveis no GenBank para o gene da toxina alfa de *C. septicum* (D17668 e S75954), e as mesmas ao serem alinhadas, mostraram-se altamente conservadas, apenas três nt eram diferentes e a seqüência de aa era idêntica. Assim, não foi possível escolher uma região que apresentasse variabilidade suficiente para realização de estudos filogenéticos.

De acordo com o dendrograma (Fig.3), foi observado a partir das seqüências de *C. septicum* avaliadas, a existência de dois grupos (1 e 2) filogeneticamente distintos. O grupo 1 constitui a maioria das seqüências disponíveis, tendo duas das sementes de vacinas e é bastante conservado. O grupo 2 apresenta seqüências com número significativo de mudanças nas seqüências de nt e de aa, e outras duas sementes utilizadas para fabricação de vacinas no Brasil. Em relação às seqüências dos isolados de campo, verificou-se que as oriundas dos isolados do Estado do Rio de Janeiro estão distribuídas nos dois grupos, demonstrando a existência de variabilidade genotípica entre isolados de *C. septicum* daquele Estado. As seqüências originadas dos isolados 19748 proveniente do Estado de São Paulo e, 16 doada pelo IBSP (Tab.1), pertencem ao mesmo grupo das sementes vacinais L-1 e L-3 (grupo 1). As seqüências originadas das sementes L-2 e L-4 pertencem ao grupo 2. Avaliando as seqüências de sementes vacinais, verificou-se que as seqüências das sementes dos laboratórios L-1 e L-3, não apresentaram nenhuma substituição de aa em relação ao consenso. Em contraste, as seqüências L-2 e L-4 apresentaram 8 e 7 trocas de aa, respectivamente. Apesar de não ter sido o objetivo deste estudo, para se saber se a presença ou a ausência das mutações estaria relacionada com a imunogenicidade de *C. septicum*, mais estudos deverão ser realizados, visto que o delineamento experimental, permitiu apenas verificar se haviam diferenças de nt e aa entre os isolados estudados e, portanto, não é possível com base nos resultados observados, concluir nada a esse respeito.

Chama-se atenção para isso, devido ao fato que todas as sementes vacinais deste trabalho (L1-L4), foram consideradas ineficientes no teste de potência de vacinas de *C. septicum* realizado por Dias (2003). Exemplos desses estudos seriam: realização do seqüenciamento completo do gene da toxina alfa de sementes vacinais com eficiência comprovada; completar o seqüenciamento dos isolados já parcialmente seqüenciados; realização de estudos de mutagênese induzida, produção de anticorpos monoclonais (mAbs) contra a toxina alfa e avaliação dos mesmos. Adicionalmente, com base no painel de mAbs, poderia ser feita a identificação dos epítomos da toxina alfa, trabalho ainda não realizado no mundo. Além disso, mediante estes seqüenciamentos, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos poderiam ser produzidos e avaliados. Desse modo, se fossem encontradas diferenças nas seqüências de aa de sementes vacinais com eficiência comprovada nos testes de vacinas em relação às deste estudo e, por meio dos estudos citados acima fosse comprovado que essas diferenças elicitassem a produção de anticorpos protetores, poderia-se concluir que a ineficiência das vacinas provenientes das sementes (L1-L4), estaria relacionada com as sementes usadas na fabricação das mesmas. Se pelo contrário, não fossem encontradas diferenças significativas entre essas seqüências, bem como pelos estudos exemplificados anteriormente, também não fossem encontrados resultados significativos; provavelmente a ineficiência das vacinas provenientes das sementes (L1-L4), estaria relacionada com o processamento laboratorial durante a fabricação das mesmas. O mesmo raciocínio aplica-se para seqüências de campo. Como por exemplo, verificou-se que as seqüências provenientes dos isolados Itaperuna e Santo Antônio de Pádua do Estado do Rio de Janeiro, apresentaram ausência e presença de mutações, respectivamente. Assim, para se saber se a ausência ou presença dessas mutações estaria relacionada com a virulência (patogenicidade) e toxigenicidade (produção de toxinas), esses isolados deverão ser avaliados quanto a esses aspectos.

Como apenas isolados de campo dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo foram seqüenciados, futuros seqüenciamentos envolvendo um número mais representativo de isolados desses estados, bem como de outras regiões brasileiras e amostras vacinais, deverão ser realizados para se concluir qual a real distribuição filogenética de *C. septicum* no Brasil, visto que Moussa (1959), já havia relatado ao avaliar 37 amostras de *C. septicum* por meio de testes sorológicos baseados nos antígenos somáticos "O" e

flagelares "H"; que o agente poderia ser dividido em seis grupos, definidos por dois antígenos somáticos (1 e 2) e cinco antígenos flagelares (a-e).

Este parece ser o primeiro trabalho na literatura comparando seqüências do gene da toxina alfa, bem como de aminoácidos de isolados de campo e sementes vacinais de *C. septicum*.

6. CONCLUSÕES

- O estudo retrospectivo revelou que *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, são os agentes mais prevalentes nos casos de mionecroses no Brasil.
- A técnica de PCR multiplex padronizada neste estudo, mostrou-se eficiente para detecção de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum* e seria, portanto, recomendável a sua implementação na rotina de diagnóstico das mionecroses no Brasil.
- Existem diferenças gênicas e de aminoácidos entre os isolados de *Clostridium septicum* estudados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O agronegócio brasileiro é uma atividade próspera, segura e rentável. Com um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados à suas cadeias produtivas. O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira e responde por um em cada três reais gerados no país. O agronegócio é responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos brasileiros. O desempenho da agropecuária brasileira é incomparável. Nenhum outro país do mundo teve um crescimento tão expressivo na agropecuária quanto o Brasil nos últimos anos. O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. Com um efetivo de 195.552 bovinos, a pecuária bovina brasileira responde por importante parcela na economia do país. De 1990 a 2003, a produção de carne bovina aumentou 85,2% ou 6,1% ao ano, passando

de 4,1 milhões para 7,6 milhões de toneladas. As exportações de carne bovina *in natura* e industrializada cresceram 40% em 2003, chegando a 1,5 bilhão de dólares. Em volume, totalizaram 1,4 milhão de toneladas. Esse desempenho colocou o país em primeiro lugar no ranking mundial das vendas do setor, superando a Austrália, até então o líder no comércio internacional do produto.

Apesar de possuir o maior rebanho comercial do mundo, a pecuária de corte em muitas regiões do Brasil, ainda é praticada de modo rústico e pode ser considerada como uma atividade extrativista. Em contraste, graças a investimentos em tecnologia, outras regiões apresentam altos índices de produtividade. Situação semelhante ocorre em relação à pecuária de leite. É interessante observar que, indiferente às condições de desenvolvimento tecnológico, algumas doenças têm acometido um grande número de animais, entre elas destacam-se as mionecroses, representadas pelo carbúnculo sintomático e pela gangrena gasosa, que constituem duas das principais doenças infecciosas dos ruminantes domésticos do país, sendo responsável por altas taxas de letalidade, acarretando grandes prejuízos aos produtores.

A ausência de programas sanitários específicos como o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), certamente tem contribuído para o ineficiente controle das mionecroses.

Apesar da caracterização dos principais agentes envolvidos nessas enfermidades ter sido feito no século XIX, fatores relacionados ao manejo, falta de assepsia nas vacinações e cirurgias, vacinas ineficientes, ausência de vacinações, aliados à presença de esporos desses agentes no trato digestivo dos animais e meio ambiente, propiciam até os dias de hoje, a ocorrência da doença de forma endêmica em todo país.

Quanto ao diagnóstico das mionecroses, a grande maioria é feita de forma presuntiva, baseando-se principalmente nos achados clínicos e de necropsia. No desenvolvimento deste trabalho, uma técnica de PCR multiplex foi padronizada e outras técnicas desenvolvidas em trabalhos anteriores como a IFD e IHQ foram implantadas na rotina laboratorial, possibilitando o diagnóstico etiológico das mionecroses e o mapeamento da ocorrência dos clostrídios envolvidos nestas enfermidades no Brasil, corroborando com o estudo retrospectivo realizado neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho, aliados à implementação das técnicas desenvolvidas na rotina laboratorial, permitirão por parte das indústrias produtoras de vacinas no país, uma reavaliação da composição das vacinas com múltiplos antígenos contra clostridioses. Este fato é de fundamental importância, em razão da maioria das vacinas contra mionecroses, serem polivalentes, e alguns dos antígenos presentes nas mesmas, ainda não haviam sido diagnosticados ou já foram diagnosticados, porém em baixa frequência.

Durante o período do experimento, identificou-se pela primeira vez no país, *C. novyi* tipo A como responsável por um quadro de gangrena gasosa em bovinos. Foi identificado *C. sordellii* em um surto de gangrena gasosa em ovinos de forma isolada. Esta condição parece ser a segunda descrita no mundo, contudo, é a primeira no Brasil. Também foi diagnosticado pela primeira vez no Brasil, casos de carbúnculo sintomático visceral com acometimento do miocárdio e, a detecção de *C. chauvoei* em associação ao *C. sordellii*, parece ser a primeira na literatura.

Os resultados encontrados no estudo retrospectivo levam à reflexão sobre a importância de *C. novyi* tipo A e *C. sordellii* como agentes responsáveis pelos quadros de gangrena gasosa e à necessidade ou não da presença desses microrganismos ou suas toxinas, na composição das vacinas clostridiais. A inclusão de cada um desses

antígenos se traduz na elaboração de um produto com maior grau de tecnologia, com conseqüente aumento do custo final.

É pertinente frizar, que vacinas contra clostridioses, depois de vacinas contra febre aftosa, são as mais vendidas no país. São produzidas e comercializadas no Brasil, em torno de 140 milhões de doses por ano. Por essas razões, a busca dos principais agentes das mionecroses deve ser implementada para que se possa em um futuro próximo, estabelecer os agentes mais prevalentes e estes subsídios permitirão as indústrias produtoras de vacinas clostridiais adequarem a formulação das mesmas.

A padronização da PCR multiplex permitirá a identificação dos isolados de *C. chauvoei* e/ou *C. septicum*, e sementes vacinais dos laboratórios que comercializam vacinas clostridiais no país que contenham em sua composição esses agentes, minimizando o uso de animais, que traz discussões éticas por parte de grupos humanitários.

Em relação às técnicas laboratoriais agora disponíveis para o diagnóstico das mionecroses no Brasil, algumas particularidades das mesmas devem ser consideradas: IFD em impressões de tecido, considerada padrão no diagnóstico e que apresenta algumas vantagens em relação ao isolamento, tem por desvantagem a necessidade do uso de conjugados não disponíveis no comércio nacional. Os mesmos são trabalhosos para produção, necessitando inclusive da utilização de animais para obtenção de soros hiperimunes. As técnicas de IHQ e PCR também são vantajosas em relação ao isolamento e à IFD, pois a maioria dos insumos necessários, encontram-se disponíveis comercialmente.

Na rotina laboratorial, observa-se com frequência, que os materiais recebidos para diagnóstico de mionecroses, são remetidos de longas distâncias e, em sua maioria, chegam ao laboratório em condições impróprias para o isolamento, bem como para a realização da IFD. A utilização das técnicas de IHQ e PCR em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (TFIP),

minimizará esta situação, pois a fixação das amostras em formol, preserva a morfologia tecidual e os componentes bacterianos. Além disso, a técnica de IHQ permite correlacionar a presença dos microrganismos com as lesões. Estas técnicas poderão ser adotadas nos laboratórios que não dispõem de equipamentos para isolamento de anaeróbios.

Os resultados encontrados no estudo de seqüenciamento e análise filogenética de seqüências parciais do gene da toxina alfa de *C. septicum* de isolados de campo e sementes vacinais do Brasil, permitiram a inclusão dos isolados trabalhados em dois grupos distintos, em função da variação de nucleotídeos e aminoácidos. Estes achados servirão como base para novos estudos moleculares visando caracterizar as mutações encontradas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L.; BUSTA, F.F. Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. *Journal Applied Bacteriology*, v.62, n.6, p.491-502, 1987.
- AL-MASHAT, R.R; TAYLOR, DJ. Production of diarrhoea and enteric lesions in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Clostridium sordellii*. *Veterinary Record*, v.112, n.7, p.141-146, 1983.
- AMIMOTO, K.; OHGITANI, T.; SASAKI, O. et al. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccine against challenge with spores in guinea pigs. *Journal Veterinary Medical Science*, v.64, n.1, p.67-69, 2002.
- 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.2, p.68-70, 2001.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E. et al. An outbreak of malignant edema in cattle. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, n.543, p.143-145, 2002.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E. et al. Clostridial myonecrosis in sheep after caseous lymphadenitis vaccination. *Veterinary Record*, v.154, n.12, p.380, 2004.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R. Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.1, p.4-8, 2005.
- BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E.M.B. et al. Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-79, no estado de São Paulo. *O Biológico*, v.51, n.6, p.161-165, 1985.
- BALLARD, J.; BRYANT, A.; STEVENS, D.; TWETEN, R.K. Purification and characterization of lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity*, v.60, n.3, p.784-790, 1992.
- BALLARD, J.; SOKOLOV, Y.; YUAN, W.L. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Molecular Microbiology*, v.10, n.3, p.627-634, 1993.
- BERGELAND, M.E. Clostridial infections. In: *Diseases of Swine*. 5ed. Ames: Iowa University, p.418-431, 1981.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M.; HENDERSON, J.A.H. *Veterinary Medicine*. 7ed. London: Bailliere Tindall. 1989, p.603-605.
- BRASIL.. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.49, 12 de maio de 1997. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 1997, seção I, p.10168-10169.
- BUXTON, D.; DONACHIE, W. Clostridial diseases. In: *Diseases of sheep*. 2ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1991, p.104-114.
- CORREA, W.M.; CORREA, C.N.N.; LOPES, C.A.M. et al. Enfermidades por clostrídios 1969-1978 (clostridial diseases 1969-1978). *Arquivo Escola UFMG*, v.32, n.3, p.369-374, 1980.

- COSTA, J.L.N.; OLIVEIRA, M.M.D.; LOBATO, F.C.F. et al. Outbreak of gas gangrene in sheep by *Clostridium sordellii* after routine clostridial vaccination. *Veterinary Record*, 2005. No prelo.
- DIAS, L.D. *Avaliação de eficiência de vacinas contra Clostridium septicum*. 2003. 29f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- GIMENO, E.J. Fundamentos da imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7, Anais...Belo Horizonte: 1995. p.17-51.
- GLASTONBURY, J.R.W.; SEARSON, J.E.; LINKS, I.J.; TUCKETT, L.M. Clostridial myocarditis in lambs. *Australian Veterinary Journal*, v.65, n.7, p.208-209, 1988.
- GYLES, C. L. Histotoxic Clostridia. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 2ed. Ames: Iowa University Press. 1993, p.106-113.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98, 1999.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- IMAGAWA, T.; DOHI, Y.; HIGASHI, Y. Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.117, n.3, p.287-292, 1994.
- HARWOOD, D.G. Apparent iatrogenic clostridial myositis. *Veterinary Record*, v.115, n.16, p.412, 1984.
- KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKISAKI, T. et al. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Veterinary Microbiology*, v.78, n.4, p.363-371, 2001.
- KUHNERT, P.; CAPAUL, S.E.; NICOLET, J. et al. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 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. *Veterinary Microbiology*, v.57, n.2-3, p.291-298, 1997.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; INGRID, B. et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona: Arizona State University, 2001.
- LEWIS, C.L.; NAYLOR, R.D. Sudden death in sheep associated with *Clostridium sordellii*. *Veterinary Record*, v.142, n.16, p.417-421, 1998.
- LEWIS, C.J. Clostridial diseases. In: *Diseases of sheep*. 3ed. Oxford: Blackwell Sciences, 1999, p.131-143.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, v.19, n.113, p.29-33, 2000.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; BALSAMÃO, G.M. et al. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.439-442, 2004.
- MARSH, H.; WELSH, H.; JUNGHER, E. Blackleg in sheep. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.27, n.1, p.63-88, 1928.
- MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; FATTORINI, F.R. et al. Malignant oedema associated with blood sampling in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.80, n.5, p.280-281, 2002a.
- MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M. Malignant oedema associated with navel infection in a Merino lamb. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.4, p.448-449, 2002b.

- MOUSSA, R.S. Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *Journal of Pathology Bacteriology*, v.77, n.2, p.341-350, 1959.
- PINTO, M.P.; ABREU, V.L.V. Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti-*Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.44, n.6, p.513-520, 1992.
- POONACHA, K.B.; DONAHUE, J.M.; LEONARD, W.H. Clostridial myositis in a cat. *Veterinary Pathology*, v.19, n.2, p.217-219, 1982.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1ed. London: 1994, 648p.
- RELATÓRIO de atividades-SERSA/MG. Local: Belo Horizonte. Delegacia Federal de Agricultura em Minas Gerais, 1982-1989, v.1-8.
- ROBERTS, R.S.; MCEWEN, A.D. Gas gangrene infections of sheep. *Journal Comparative Pathology and Therapeutics*, v.44, n.3, p.180-191, 1931.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, n.4, p.406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology*, v.86, n.3, p.257-267, 2002a.
- SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; KIKUCHI, E. et al. Multiplex PCR for direct detection of pathogenic clostridia in bovine clostridial infections. *Journal of Veterinary Medicine*, v.55, n.11, p.889-893, 2002b.
- SHAPTON, D.A.; BOARD, R.D. *Isolation of Anaerobes*. New York: Academic Press. 1971, 269p.
- SIPPEL, W.L. Diagnosis of clostridial diseases. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.161, n.11, p.1299-1305, 1972.
- SOJKA, J.E.; BOWERSOCK, T.L.; PARKER, J.E. et al. *Clostridium chauvoei* myositis infection in a neonatal calf. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* v.4, n.2, p.201-203, 1992.
- SMITH, L.D.S. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. 3ed. Illinois: Thomas, Springfield. 1984, 550p.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. London: Butlerworths. 1975, 144p.
- STERNE, M. Clostridial infections. *British Veterinary Journal*, v.137, n.5, p.443-454, 1981.
- TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T. et al. Detection of *Clostridium septicum* Hemolysin Gene by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.59, n.9, p.853-855, 1997.
- 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. *Veterinary Microbiology*, v.91, n.2-3, p.239-248, 2003a.
- UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M.; ASSIS, R. et al. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. *Veterinary Record*, v.152, n.5, p.134-136, 2003b.
- VANNELLI, S.A.; ROBERTS, R.G.; UZAL, F.A.; MOREIRA, A.R. *Clostridium sordellii* associado a un caso de gangrena gaseosa ovina. *Veterinária Argentina*, v.23, n.126, p.42-422, 1996.
- WILLIAMS, B.M. Clostridial myositis in cattle: bacteriology and gross pathology. *Veterinary Record*, v.100, n.5, p.90-91, 1977.