

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO  
ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA  
DE VACINAS CONTRA GANGRENA GASOSA  
CAUSADA POR *Clostridium perfringens* tipo A.**

**JOSÉ AZAEL ZAMBRANO URIBE**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2013**

**José Azael Zambrano Uribe**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO  
ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA  
DE VACINAS CONTRA GANGRENA GASOSA  
CAUSADA POR *Clostridium perfringens* tipo A.**

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

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Elias Jorge Facury Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Lobato

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2013

U76d Uribe, José Azael Zambrano, 1985-  
Desenvolvimento de um modelo animal para avaliação da eficiência de vacinas contra gangrena gasosa por *Clostridium perfringens* tipo A / José Azael Zambrano Uribe. – 2013.

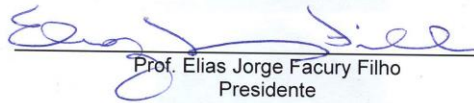
60 p. : il.


Orientador: Elias Jorge Facury Filho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

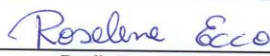
1. *Clostridium perfringens* – Teses. 2. Clostridioses – Vacinas – Teses. 3. Vacina veterinária – Teses. 4. Animais – Doenças – Teses. I. Facury Filho, Elias Jorge.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 69

Dissertação defendida e aprovada em 24 de Janeiro 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof. Elias Jorge Facury Filho  
Presidente

  
Prof. Ronnie Antunes de Assis

  
Profª. Roselene Ecco

**Existe uma força muito mais poderosa que o vapor, eletricidade e a energia atômica:**

***“A vontade”***

**Albert Einsten**

Dedico este trabalho aos meus avós:

Avô Azael Zambrano, uma das pessoas mais especiais da minha vida e que sempre torceu para que me tornasse um Médico Veterinário. Apesar de não estar mais aqui, sei que se sentiria orgulhoso de ver seu neto terminar mais um projeto. A você, toda minha admiração e carinho.

Avó Marbella Fajardo, exemplo de amor incondicional. Uma mulher batalhadora que dedicou a vida toda em prol de seus filhos para dar a eles tudo o que fosse necessário, mas sem nunca deixar faltar o mais importante, o amor de mãe.

---

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por ter me dado o dom da vida e ainda a graça de ser capaz de aprender e ter forças para ir atrás de meus sonhos e projetos.

Aos meus queridos pais, Alexander Zambrano e Xiomara Uribe, pelo ensino de amor e dedicação aos filhos. Por me proporcionarem a chance de estudar e sair atrás daquilo que sonho. Meu pai, um exemplo de homem trabalhador, sempre se esforçando em busca de dar o melhor para que seus filhos fossem capazes de estudar e obter o sucesso. Minha mãe, exemplo de retidão, sempre incentivadora do conhecimento, com aquele amor de mãe.

À Yesica e Roger Zambrano, mais que meus irmãos, são também meus amigos. Por estarem ao meu lado, sempre torcendo pelo meu sucesso e felicidade.

A os meus orientadores:

Professor Elias Jorge Facury Filho, que além de meu orientador, foi como um pai para mim. Não se demonstrou preocupado apenas com meu aprendizado e crescimento profissional, mas também pela minha vida pessoal. Nos momentos difíceis havia sempre um conselho, uma conversa e um sorriso para que tudo se tornasse mais fácil para buscar a solução de que eu precisava. Coisas que só um pai faz por um filho.

Professor Antônio Último por sua sabedoria e experiência, sempre pronto a uma conversa inspiradora. Por acolher a todos os seus alunos como filhos e a nós dedicar uma atenção paternal, de modo a entender os nossos anseios e dúvidas.

Professor Francisco Lobato por se mostrar sempre pronto a ajudar, foi uma peça fundamental nas bases do experimento, pelas ideias e disposição.

Prhiscylla Sadanã Pires que desde o início do meu mestrado se tornou “minha quarta orientadora”. Em todos aqueles dias de trabalho, sempre se mostrou pronta a ajudar e ensinar com dedicação, paciência a quem não sabia nem pegar em uma alça microbiológica. Dessa forma, graças à sua exigência pude aprender e compreender a importância de um trabalho organizado.

À Prof<sup>a</sup>. Roselene Ecco pela ajuda em todos os aspectos e ensinamentos. Os conhecimentos, orientações e ajuda em relação à patologia veterinária foram de fundamental importância para a realização do experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Anaeróbios do DMVP, Rodrigo, Filipe, Guilherme, Monique, Laura, Amanda, Carlos, que sempre estiveram prontos a ajudar na realização dos meus experimentos.

À Luiza Bossi Leite, por ser minha namorada, amiga e companheira e estar ao meu lado sempre com uma palavra de carinho e muito amor. Acreditando em mim e me incentivando a continuar.

Aos amigos, Rodrigo Melo Meneses, Moisés Dias Freitas, Marina, Leandro Caxito e Leandro De Paula por terem se tornado mais que amigos e sim irmãos, uma família escolhida por mim. Por estarem sempre comigo em todos os momentos.

À Audrey Texeira Franco pela amizade antiga e sincera, por sempre se preocupar comigo e se interessar.

Ao Diogo pelo apoio no experimento, por ficar em todas as necropsias, avaliações clínicas, demonstrando muito interesse e disposição em ajudar.

À Elizabeth Hortencio (Bety) e Filipe Mendonça pela ajuda na parte clínica do experimento, ficando na escola para realização do exame clínico dos animais o tempo todo. Prof. Francisco Uzal, pelas ideias importantes para o desenvolvimento do experimento.

Drs. José Antônio Contreras e Jorge Escalona, peças fundamentais de ensino e motivação, desde o início da minha formação como M.V. Graças a eles, minha afinidade pela clínica de bovinos.

À Patrícia Bossi, por me receber como um filho e ainda ter sempre uma palavra de apoio e incentivo de que tudo vai dar certo.

Ao Seu João que por dois anos aturou um gringo em sua casa e sempre com boa disposição e transmitindo alegria a todos.

Simón Romero, Oswaldo Mendez, Carlos Izarza e Victor Bocaranda, por serem meus melhores amigos e mesmo à distância nossa amizade permanece.

À família Ruminantes, Gustavo, Luciele, Ronaldo, Marcella, Tiago Facury, Fernando Passon e Júlia por me acolherem como mais um irmão.

À Ana Carolina Diniz Matos pela importante ajuda dada na última fase do experimento.

Ao Francisco Vargas, Victor Bermúdez, William Zambrano, Audrey Torres, pela motivação para continuar meus estudos, Ana Corro e Victoria Colmenarez professores chaves na minha formação.

Ao CNPq e o PEC-PG por permitir a realização do meu mestrado auxiliando em todos os aspectos, sem vocês não seria possível alcançar este logro.

MUITO OBRIGADO.



---

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. LITERATURA CONSULTADA</b> .....	16
<b>2.1. <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e suas toxinas</b> .....	16
<b>2.2. Histórico da Gangrena gasosa</b> .....	19
<b>2.3. Tratamento e profilaxia da gangrena gasosa</b> .....	21
<b>2.4. Vacinas contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo A</b> .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1. Local de realização do experimento</b> .....	24
<b>3.2. Animais utilizados</b> .....	24
<b>3.3. Obtenção dos Imunógenos</b> .....	24
3.3.1. <i>Amostra de referência</i> .....	24
3.3.2. <i>Cultivo e fermentação da amostra</i> .....	24
3.3.3. <i>Fabricação do placebo e vacinas</i> .....	25
3.3.4. <i>Controle de qualidade e inocuidade das vacinas</i> .....	26
<b>3.4. Avaliação das vacinas</b> .....	26
3.4.1. <i>Esquema de imunização e desafio</i> .....	27
3.4.2. <i>Avaliação clínica dos cobaios inoculados</i> .....	27
3.4.3. <i>Avaliação macroscópica</i> .....	31
<b>3.5. Análises estatísticas</b> .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>4.1. Determinação da dose para o desafio</b> .....	34
<b>4.2. Resultados dos desafios dos animais imunizados</b> .....	35
4.2.1. <i>Caracterização clínica da doença</i> .....	35
<b>4.2.1.1. Intensidade e extensão do edema</b> .....	36
<b>4.2.1.2. Locomoção e sensibilidade</b> .....	36
<b>4.2.1.3. Aspecto, tipo e cor da lesão</b> .....	37
4.2.2. <i>Avaliação clínica por parâmetros</i> .....	41
<b>4.2.2.1. Locomoção</b> .....	41
<b>4.2.2.2. Sensibilidade</b> .....	42
<b>4.2.2.3. Edema</b> .....	44

4.2.2.4.	Aspecto da lesão .....	45
4.2.2.5.	Extensão do edema .....	47
4.2.2.6.	Tipo de Lesão .....	48
4.2.2.7.	Presença de gás no músculo .....	50
4.2.2.8.	Cor da Lesão .....	51
4.2.2.9.	Mensuração dos membros pélvicos .....	52
4.2.3.	<i>Escore Clínico Total</i> .....	53
4.3.	<b>AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS</b> .....	58
4.4.	<b>Escore Macroscópico Total</b> .....	63
4.5.	<b>CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CLÍNICO TOTAL E ESCORE MACROSCÓPICO TOTAL</b> .....	65
5.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Composição das vacinas avaliadas, em cobaios inoculados experimentalmente com <i>Clostridium perfringens</i> tipo A pela via intramuscular.....	26
Tabela 2: Diferentes vacinas avaliadas, origem do produto fabricado e a sua composição .....	26
Tabela 3: Esquema de imunização dos cobaios para avaliação de quatro vacinas contra <i>Clostridium perfringens</i> tipo A. ....	27
Tabela 4: Alterações clínicas, escore, classificação e interpretação para avaliação clínica de cobaias imunizadas e desafiadas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular....	28
Tabela 5: Alterações macroscópicas, escore, classificação e interpretação para avaliação clínica de cobaias imunizadas e desafiadas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	31
Tabela 6 Concentrações bacterianas do inóculo, presença de lesão muscular, sobrevivência e mortalidade em 50 cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) inoculados com cinco concentrações de células vegetativas de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A pela via intramuscular. ....	34
Tabela 7: Escores de Locomoção, Sensibilidade, Edema, Aspecto da lesão, Extensão do edema, Tipo de lesão, Cor da lesão, Presença de gás no músculo e Escore clínico total dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) do grupo controle Positivo, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ unidades formadoras de colônias/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	35
Tabela 8 Escore de Locomoção dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ unidades formadoras de colônias/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	41
Tabela 9 Escore de Sensibilidade dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	43
Tabela 10 Escore de Edema dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	44
Tabela 11: Escore Aspecto da Lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	45
Tabela 12: Escore Extensão do Edema dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	47
Tabela 13: Escore Tipo de Lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	49
Tabela 14: Escore Presença de gás no músculo dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	50

Tabela 15: Escore Cor da Lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	51
Tabela 16: Mensurações do diâmetro dos membros pélvicos inoculados e não inoculados de cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, com diferentes protocolos de imunização, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	53
Tabela 17: Escores Clínicos Totais dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	54
Tabela 18: Escores dos parâmetros macroscópicos avaliados nos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	59
Tabela 19: Escores necroscópicos totais dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	63
Tabela 20: Tabela 20. Correlação entre os Escores Clínicos e Necroscópicos dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	65

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1: Comportamento dos Escores de Intensidade e Extensão do Edema, Locomoção e Sensibilidade, Aspecto, Tipo e Cor da Lesão, Presença de Gás no Músculos dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) do grupo controle Positivo, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> unidades formadoras de colônias/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	35
Gráfico 2: Comportamento do Escore de locomoção dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	42
Gráfico 3 Comportamento do Escore de Sensibilidade dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	43
Gráfico 4 Comportamento do Escore de Edema dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	45
Gráfico 5: Comportamento do Escore Aspecto de Lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	46
Gráfico 6: Comportamento do Escore Extensão do Edema dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	47
Gráfico 7: Comportamento do Tipo da Lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com 10 <sup>7</sup> UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	49

Gráfico 8: Comportamento do Escore Presença de gás no músculo dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular.....	51
Gráfico 9: Comportamento do Escore cor da lesão dos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, pela via intramuscular. ....	52
Gráfico 10: Comportamento dos Escores Clínicos Totais de cobaios imunizados e desafiados por <i>Clostridium perfringens</i> tipo A pela via intramuscular, em 70 horas de avaliação.....	54
Gráfico 11 Gráfico 11. Dispersão por grupo dos escores clínicos totais dos cobaios imunizados e desafiados por <i>Clostridium perfringens</i> tipo A pela via intramuscular em 70 horas de avaliação. ....	55

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Alterações clínicas observadas em cobaios não imunizados e desafiados com células vegetativas de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A (ATCC 13124). ....	39
Figura 2: Progressão das lesões macroscópicas observadas em cobaios não imunizados e desafiados com células vegetativas de <i>Clostridium perfringens</i> tipo AA (ATCC 13124).. ....	40
Figura 3: Alterações macroscópicas encontradas nos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A (ATCC 13124), pela via intramuscular.....	61
Figura 4: Alterações macroscópicas encontradas nos cobaios ( <i>Cavia porcellus</i> ) dos seis grupos, desafiados com $10^7$ UFC/ mL de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A (ATCC 13124), pela via intramuscular.....	62

## RESUMO

As mionecroses causadas por infecções do *Clostridium perfringens* tipo A são caracterizadas por curso rápido e letalidade alta, desconhecendo-se o impacto que tem tanto na pecuária nacional como mundial. Objetivou-se com o presente trabalho estabelecer um modelo de indução experimental da gangrena gasosa por meio da inoculação de bactérias vegetativas do *Clostridium perfringens* tipo A. Assim como também, avaliar a eficácia de três vacinas experimentais (Toxóide, Bacterina, Bacterina + Toxóide) e uma de origem comercial. Utilizando 98 cobaias (*Cavia porcellus*) albinas da linhagem “English short ear”, machos, com peso entre 300 e 500 gramas. Dessas, 50 foram utilizadas para estabelecer a dose de desafio e 48 para a avaliação da eficácia das vacinas. Para reprodução experimental da mionecrose em cobaios, produção da bacterina e do toxóide utilizou-se uma amostra de referência do *American Type Culture Collection* de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), pertencente à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFGM. A totalidade dos cobaios (48) foram divididos em seis grupos, administrando um mL por via subcutânea do imunógeno ou placebo no dia zero, e, no dia 21, após a primeira vacinação, todos os grupos receberam um reforço ou placebo novamente. Foram desafiados os animais inoculando  $10^7$  UFC/ mL de bactérias vegetativas do *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular. Todos os animais foram avaliados clinicamente duas horas antes da inoculação e a cada duas horas depois deste momento, até 72 horas após o desafio. Foram utilizadas as avaliações feitas em momentos considerados de maior importância, totalizando sete observações. Posteriormente, todos os animais foram eutanasiados e imediatamente necropsiados e as alterações foram avaliadas. Os parâmetros clínicos e necroscópicos foram definidos em escore por parâmetro e totais. Quando comparados os escores clínicos máximos dos grupos, determinou-se que o grupo Bacterina + Toxóide (10,80) foi o que apresentou melhor comportamento, não encontrando-se diferença estatística quando comparado com o grupo Controle Negativo, seguido dos grupos Toxóide (13,13), Toxóide Comercial (13,25), apresentando sinais leves da doença. O grupo Bacterina foi considerado como ineficiente, apresentando o maior escore clínico total das vacinas avaliadas (28,71), não encontrando diferença estatística quando comparado com o grupo Controle Negativo. Estes resultados foram observados também no escore necroscópico total, sendo melhor o grupo Bacterina + Toxóide (12,8), seguido pelos grupos Toxóide (16,25), Toxóide Comercial (15,38), Bacterina (27,14), Controle Negativo (10,00) e Controle Positivo (29,57). Concluindo, o melhor protocolo de imunização foi Bacterina + Toxóide, é possível avaliar a eficácia de vacinas utilizando este modelo, podendo ser utilizado como padrão para avaliações de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A e outros clostrídios histotóxicos causadores de mionecrose.

**Palavras-chave:** *Clostridium perfringens*, mionecrose, bacterina, toxóide, vacina.

## ABSTRACT

The myonecroses infections caused by *Clostridium perfringens* type A are characterized by rapid course and high mortality, not knowing the impact it has on both national and global livestock. The objective of the present work was to establish a model of experimental induction of gas gangrene by inoculation of vegetative bacteria *Clostridium perfringens* type A, as well as to assess the efficacy of three experimental vaccines (toxoid, bacterin, toxoid + bacterin) and another of commercial source. Were used 98 albino guinea pigs (*Cavia porcellus*) of the lineage "Inglês short ear", males, weighing between 300 and 500 grams. Of these total, 50 were used to establish the dose of challenge and 48 for assessing the effectiveness of vaccines. For experimental reproduction of myonecrosis in guinea pigs and the production of the bacterin and toxoid were used a reference sample of the American Type Culture collection<sup>2</sup> of *Clostridium perfringens* type A (ATCC 13124) belonging to the Anaerobic Laboratory EV -UFMG. The totality of guinea pigs (48) was divided into six groups. Were administer one ml of the immunogen subcutaneously or placebo on day zero and, at day 21 after primary vaccination, all groups were boosted or received placebo again. The animals were challenged by inoculating 107 CFU/mL vegetative bacteria *Clostridium perfringens* type A intramuscularly. All animals were clinically evaluated two hours before inoculation and every two hours after this until 72 hours after the challenge. The assessment was made at times considered most important, with a total of seven observations. Subsequently, all animals were euthanized and necropsied immediately after to evaluate the changes. The clinical and autopsy parameters were defined by parameter and total score. When comparing the maximum clinical scores of the groups, it was determined that the Bacterin + Toxoid group (10.80) showed the best behavior, not finding a statistical difference when compared with the Negative Control group, followed by Toxoid group (13.13) and Commercial toxoid (13.25), with minor signs of illness. The Bacterin group was considered as inefficient, with the highest total score of the evaluated clinical vaccines (28.71), finding no statistical difference when compared with the Positive Control group. These results were also observed in the total score autopsy, with the best results being in Bacterin + Toxoid group (12.8), followed by Toxoid group (16.25), Commercial Toxoid (15.38), Bacterin (27.14), Negative Control (10.00) and positive control (29.57). In conclusion, the best immunization protocol was Bacterin + Toxoid. It is possible to assess the effectiveness of vaccines using this model and could be used as a standard for evaluating vaccines against *Clostridium perfringens* type A and other histotoxics clostridia that causes myonecrosis.

**Keywords:** *Clostridium perfringens*, myonecrosis, bacterin, toxoid vaccine.

## 1. INTRODUÇÃO

As clostridioses são doenças causadas a partir de infecções por bactérias do gênero *Clostridium* e/ou intoxicação por suas toxinas, caracterizadas por curso rápido e letalidade alta. Os clostrídios são bactérias Gram positivas, anaeróbicas estritas e altamente resistentes ao meio ambiente, já que possuem habilidade de esporularem quando expostos às condições extremas. Existem, aproximadamente, 100 espécies de *Clostridium* distribuídas em diversas regiões geográficas, sendo muitas comensais do trato gastrointestinal. Entretanto, apenas 14 espécies são consideradas patogênicas para diversos seres vivos (Lobato et al., 2007).

As mionecroses clostridiais são doenças causadas por infecções necrotizantes do tecido muscular. São divididas em gangrena gasosa e carbúnculo sintomático, diferenciadas pela via de entrada do agente etiológico, sendo uma exógena e a outra endógena, respectivamente. A gangrena gasosa em humanos é bem relatada como uma doença frequentemente encontrada após procedimentos cirúrgicos ou traumatismos, na qual o agente de maior importância é o *Clostridium perfringens* tipo A. Caracteriza-se, inicialmente, por: aumento de volume do tecido afetado, edema manifesto e evoluindo para coloração pálida ou cinza, ausência de sensibilidade e hemorragia ao corte do tecido afetado, presença de gás e, ao estudo histológico, pouca resposta inflamatória, o que acontece poucas horas após a exposição ao agente (Urschel, 1999).

Os bovinos são afetados por esta bactéria originando diversas doenças. Em bezerras neonatas foram relatadas alterações no abomaso com inflamação, úlceras e timpanismo (Roeder et al., 1988; Songer e Miskimins., 2005; Van Metre., 2006). Em bovinos adultos a enfermidade ocorre com maior frequência em vacas, sendo a

principal manifestação a síndrome do jejuno hemorrágico, caracterizada por enterite hemorrágica com posterior obstrução intestinal, devido à formação de coágulos no intestino delgado (Kalender et al., 2007; Godden., 2003; Abutarbush. et al., 2004; Tajik et al., 2010). Outras doenças que podem estar relacionadas ao agente são as mastites necróticas (Schoonderwoerd et al., 1990; Gonçalves, 2006) e a mionecrose (Guilhardi et al., 2008; Pires, 2011).

*Clostridium perfringens* tipo A é responsável por causar infecções entéricas em humanos e animais, sendo constantemente isolado em casos de celulite anaeróbica e gangrena gasosa, embora seja habitante normal da flora intestinal desses indivíduos (Songer, 1996). Estudos com a toxina alfa purificada demonstraram que ela é capaz de causar acentuada redução na perfusão vascular (15-40%) uma hora após inoculação intramuscular em ratos. Também pode-se observar lesões histológicas. A diminuição do aporte sanguíneo é responsável pela redução no potencial de oxirredução tissular, condição que, além de favorecer a multiplicação desses clostrídios, contribui com a necrose, embora a morte das fibras ou células musculares ocorra antes da redução substancial do fluxo sanguíneo (Hickey et al., 2008).

As mionecroses causadas por *C. perfringens* tipo A já foram descritas em diversas espécies de mamíferos como elefante (Rahman et al., 2009), cavalos (Choi et al., 2003), bovinos (Guilhardi et al., 2008) e humanos. Apesar de ser um microrganismo amplamente disseminado, não existe um número significativo de relatos quanto à natureza clínica e ocorrência da doença em ruminantes.

Pires (2011) realizou um estudo retrospectivo utilizando amostras compostas de material oriundo de vinte e



oito bovinos (87,5%) e quatro ovinos (12,5%), totalizando trinta e duas suspeitas de mionecrose. A maioria dos casos foram positivos para imunohistoquímica apenas para *C. chauvoei*, seguido de positivos apenas para *C. perfringens* tipo A.

Diferentes estudos têm sido orientados na fabricação de vacinas contra gangrena gasosa causada por *Clostridium perfringens* tipo A. A primeira tentativa é do ano de 1930 com a fabricação de um toxóide utilizado em humanos na segunda guerra mundial, aparentemente obtendo bons resultados, com a limitante de não ter capacidade de produzir um volume suficiente para imunizar a totalidade do batalhão (Titball, 2009). Em 1972 foi avaliado o potencial de um toxóide para prevenir a gangrena gasosa em ovinos experimentalmente inoculados, utilizando projéteis contaminados com *Clostridium perfringens* tipo A, na tentativa de desenvolver um imunógeno para uso em humanos. Nos ovinos previamente vacinados foram obtidos resultados satisfatórios (Boyd, 1972). Na atualidade, a maioria dos estudos não é mais direcionada ao desenvolvimento de imunógenos para prevenir a doença em humanos, mas sim em animais domésticos, basicamente divididos em duas procuras: uma delas utilizando proteínas recombinantes da toxina alfa, considerados como não tóxicos, e outra com toxóides (Titball, 2009).

O código de regulação federal dos Estados Unidos (CFR, 2012) a Farmacopeia Europeia são referência quanto à avaliação de imunógenos no mundo. Estes códigos estabelecem para a avaliação de vacinas contra mionecrose por *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, respectivamente, imunização de animais susceptíveis (cobaias) no dia zero com reforço no dia vinte e um. Desafiando-os quinze dias após o reforço pela via intramuscular com observação de morte e sobrevivência por setenta e duas horas, não

existindo parâmetros para *Clostridium perfringens* tipo A.

Objetivou-se com o seguinte trabalho desenvolver um modelo de avaliação da eficiência de um toxóide encontrado comercialmente, assim como também, um toxóide, uma bacterina e uma bacterina associada a um toxóide, fabricados no laboratório de anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, todos com o *Clostridium perfringens* tipo A como base, utilizando-se graus de lesão muscular obtidos através de avaliações clínicas e necroscópicas. Com isso, realizou-se uma avaliação muito mais rigorosa e que, de certa forma, incrementou-se à exigência das vacinas.

Na atualidade não foi avaliada a importância da mionecrose causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A na pecuária brasileira e mundial. O seguinte trabalho é uma contribuição para se conhecer e compreender o comportamento clínico, clínico-laboratorial, assim como também necroscópico da mionecrose por esse agente etiológico. Além disso, avaliar a eficiência da única vacina encontrada atualmente no mercado brasileiro com esse agente específico. Propor, também, um método de avaliação tanto para vacinas de *Clostridium perfringens* tipo A, como para vacinas contra outros clostrídios histotóxicos.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1. *Clostridium perfringens* tipo A e suas toxinas

O *Clostridium perfringens* foi descrito pela primeira vez pelo médico patologista William H. Welch e sua equipe de trabalho no ano 1892 após realizar uma necropsia de um homem de trinta e oito anos de idade. O mesmo apresentava há um ano, histórico de tumor perto da região da clavícula, alcoolismo, sífilis e tuberculose pulmonar. Um mês antes da morte, o paciente apresentou três episódios de

hemorragia e foram encontradas ulcerações na periferia do tumor. Na necropsia foram evidenciadas regiões de crepitação simétrica e com marcado edema distribuídos na musculatura do pescoço, peitoral, braços e coxa, assim como também na submucosa das veias jugular, femorais e braquiais e lesões de tuberculose disseminada. Além de um trombo localizado na jugular. No exame microscópico do trombo sanguíneo e tecidos alterados foram descritos abundantes bacilos similares à espessura do *Bacillus anthracis*, com extremidades ligeiramente arredondadas, capsulados e distribuídas em massas irregulares. Não foram encontrados microrganismos com outros tipos de morfologia. A bactéria foi nomeada de *Bacillus aerogenes capsulatus*, posteriormente denominado como *Bacillus welchii* em homenagem ao descobridor do agente (Lucey e Hutchin, 2004).

Estudos posteriores foram realizados por Welch inoculando a bactéria isolada no paciente necropsiado em ratos pela via intravenosa. Os ratos morreram poucas horas após e os coelhos morreram em dois dias após a inoculação. Na necropsia, os coelhos apresentaram múltiplas bolhas de gás nos vasos sanguíneos. O experimento conferiu a teoria que o gás encontrado nos vasos sanguíneos do humano era produto daquele bacilo isolado na necropsia. Uma das conclusões do pesquisador foi que o agente precisava de certo grau de anaerobiose explicando como a pouca oxigenação dos tecidos no humano produto da anemia secundária à hemorragia e à tuberculose, poderiam ser fatores que permitiram o crescimento, disseminação da bactéria e formação de gás no organismo antes da morte. Esta condição de anaerobiose e ou aerotolerância foi corroborada pela avaliação do crescimento da bactéria pelo método de Buchner's, determinando que o bacilo tinha a capacidade de crescer mesmo antes de ser consumido a totalidade do oxigênio. Em

1929 foi reconhecido o *Bacillus welchii* como *Clostridium welchii*, sendo responsabilizado como agente patogênico de maior importância durante a primeira guerra mundial por causar gangrena gasosa em pessoas com ferimentos prévios (Lucey e Hutchin, 2004).

Essa bactéria cresce vigorosamente a temperaturas entre 20 e 50 °C, sendo seu maior crescimento a 45 °C. Quando são cultivadas em placas de Agar sangue, dupla hemólise é observada, uma hemólise total e uma parcial ao redor da colônia bacteriana devido à ação hemolítica das toxinas alfa e teta, respectivamente. Em Agar gema de ovo é observada uma região opaca produto da capacidade que o microorganismo tem de produzir lecitinase. Além disso, tem a capacidade de reduzir o nitrato, fermentar a glicose, maltose, sacarose e outros açúcares (Hatheway, 1990).

Existem cinco subtipos de *Clostridium perfringens* (A, B, C, D, E) classificados segundo a produção de toxinas maiores (alfa, beta, épsilon e iota). Além dessas, são conhecidas toxinas menores (delta, teta, kappa, lambda, mu, nu, gamma, eta, neuraminidase e enterotoxina). A maioria com uma atividade biológica definida (Hatheway, 1990).

O *Clostridium perfringens* tipo A é um bacilo Gram positivo, catalase negativo, imóvel, com esporos subterminais e ovais; requerendo condições de anaerobiose para seu crescimento. No entanto, tolera uma exposição moderada ao oxigênio e uma redução relativamente baixa no potencial de oxirredução para seu crescimento (Heikinheimo, 2008). Tem sido frequentemente isolado de conteúdo intestinal de animais clinicamente normais (Siqueira et al., 2012).

A toxina alfa é a mais estudada das toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens* tipo A, e reconhecida como a de maior importância na patogênese de diferentes

doenças causadas em animais e humanos (Titball, 1999).

Os primeiros estudos foram realizados por Nagler em 1939, nos quais observou-se que depois de adicionar culturas de *Clostridium welchii* tipo A em soro de humano, o mesmo apresentou opalescência e separação de camada de gordura precipitando-se ao extremo superior do meio líquido. Posteriormente, foram realizados os mesmos procedimentos com diferentes bactérias e coincidentemente os resultados para todas as estirpes de *Clostridium welchii* foram similares. Estes não apresentaram alteração quando eram adicionados outros tipos de bactéria em soros de humanos, nem em soros nos quais eram colocadas antitoxinas contra *Clostridium welchii*, hipotetizando que a bactéria tinha a capacidade de eliminar alguma substância que causaria esse efeito.

Foi quando Macfarlane e Knight no ano 1941 descobriram que a toxina alfa de *Clostridium welchii* era capaz de causar uma reação em uma emulsão composta de gema de ovo e solução salina, encontrando uma opalescência muito mais acentuada que a observada no soro sanguíneo e com formação de uma espécie de creme produto da coalescência de glóbulos de gordura, assim como também hemólise. Com esse trabalho concluiu-se que a toxina alfa do *Clostridium welchii* era responsável pela reação tanto no soro sanguíneo, estudo realizado por Nagler em 1939, como na emulsão de gema de ovo, devido à degradação da lecitina presente nos mesmos. Sabendo que a lecitina tem uma importante função estabilizadora nas emulsões de gordura e proteína e pela hemólise (reações que se acentuavam quando era adicionado cálcio), concluiu-se que as toxinas: beta, iota e épsilon não tinham efeito nenhum nas alterações encontradas (Macfarlane e Knight, 1941).

A toxina alfa é uma metaloenzima que possui trezentos e setenta resíduos de

aminoácidos, é composta de uma Fosfolipase C (PLC), Esfingomielinase (SMASE) e substâncias com atividades biológicas que causam hemólise, morte celular e dermonecrose. Estudos cristalográficos mostram que a toxina alfa possui dois domínios, o N-domínio que é integrado por nove alfas hélices e o C-domínio com oito filamentos antiparalelo beta – sanduíche, importantes para a ligação da toxina com a membrana celular da espécie afetada. Esta toxina, em altas concentrações, provoca uma degradação maciça da membrana celular, ativando a cascata do ácido araquidônico, com produção do tromboxano A<sub>2</sub>. Além disso, induz à produção e liberação de mediadores intercelulares das células endoteliais, com formação de uma molécula de adesão intracelular, a interleucina-8, do fator de necrose tumoral- alfa, do fator ativador de plaquetas e de uma molécula de adesão endotelial de leucócitos. Esses fatores contribuem para uma maior permeabilidade vascular, com agregação plaquetária, edema e morte celular (Sakurai et al., 2004).

O comprimento das cadeias de carbonos dos grupos carboxilos graxos contidos nos lipossomas das células dos mamíferos, e o seu grau de saturação são fatores importantes para a ligação da toxina na célula, hidrólise de fosfolipídios e ruptura da membrana celular. Lipossomas que contêm entre 12 a 14 grupos carboxilas insaturadas são mais suscetíveis a hidrólise, quando comparados com os lipossomas que contêm 16 a 18. Mas estes por terem uma ligação dupla, são mais susceptíveis ao rompimento da membrana celular. Além disso, o grau de saturação das cadeias dos fosfolipídios facilita os contatos hidrofóbicos da enzima com os fosfolipídios alvos da membrana celular do hospedeiro (Flores-Díaz et al., 2004). Os íons de cálcio também são considerados essenciais para a interação da toxina alfa com as bicamadas de fosfolipídios da membrana celular, a molécula de cálcio

liga-se com a toxina no domínio C terminal, que a sua vez é ligada com as cabeças polares dos fosfolipídios (Guillouard et al., 1996).

A toxina alfa tem a capacidade de ocasionar lise de hemácias, sendo as espécies na ordem de susceptibilidade a humana e murina, posteriormente o carneiro e por último o equino. As membranas celulares dos eritrócitos da espécie murina possuem proporções semelhantes de fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto os de ovinos possuem maior proporção de esfingomiéline e os de equinos uma proporção mais elevada de fosfatidilcolina. Podendo ter esta diferença na composição de fosfolipídios de membrana alguma influência na sensibilidade à ação hemolítica da toxina alfa em diferentes espécies (Sakurai et al., 2004).

Um estudo realizado *in vitro* usando duas linhas celulares neoplásicas humanas, adicionando uma dose de 200 microgramas de toxina alfa por mililitro de solução, resultou em diferenças no percentual de lise celular entre as linhas celulares estudadas (Lee e Sartorelli, 1983), o que motivou a estudar se existia algum tipo de resistência celular à ação tóxica da toxina alfa. Um estudo mais recente foi realizado fabricando mutantes de fibroblastos de pulmão de hamster (Células Don) hipersensíveis à toxina alfa de *Clostridium perfringens* tipo A, demonstrando que estas células eram deficientes para metabolizar glicose. (Florin, 1991). Estas células mutantes foram expostas a quinze nanogramas da toxina alfa por mililitro de solução por duas horas, obtendo uma marcada diminuição da viabilidade celular, o que confirmou a hipersensibilidade celular à ação da fosfolipase C, até 105 vezes mais sensível que células selvagens, assim como também, o estudo ajudou a elucidar a patogênese e suscetibilidade da gangrena gasosa em pacientes diabéticos (Flores-Díaz et al., 1998).

Embora a toxina considerada mais importante produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A, seja a alfa, o agente bacteriano é capaz de produzir outras toxinas com ação conhecida ou ainda em estudo, como: teta, perfringolisina O (Awad et al., 2001; Kennedy et al., 2009), enterotoxina (Garcia-Alvarado et al., 1992; Wang et al., 2011), beta 2 (Bacciarini et al., 2000) e net B (Martin e Smyth, 2009; Keyburn et al., 2010).

## 2.2. Histórico da Gangrena gasosa

A gangrena gasosa foi descrita pelos americanos na década dos trinta, como uma doença necrosante regional, que afetava a musculatura estriada, caracterizada por edema intenso, produção de gás, com usual odor putrefeito e alta taxa de mortalidade (Callander et al., 1938).

Foi descrita uma doença similar desde a época de Hipócrates, que apesar da ignorância quanto a sua etiologia, permitiu descrever o comportamento clínico dos casos atendidos. Maisonneuve (1853) denominou a doença como “Gangrena fulminante”, acontecendo vários casos clínicos nos anos seguintes na Guerra de Criméia. Em 1864 Pirogoff, chamou a doença de “Edema gangrenoso agudo”. Bottini em 1871 foi o primeiro em demonstrar que era de natureza infecciosa e transmissível. Em 1877, Pasteur e Joubert, descobriram um agente patogênico anaeróbio o qual foi nomeado como “*Vibrion septique*”. Estudos realizados por Koch e Gafkky em 1881 na Alemanha, descreveram um micro-organismo anaeróbio idêntico ao descrito pelo Pasteur (1877), responsável por ocasionar o “Edema maligno”, que na França era conhecido por Chauveau como “Gangrena septicêmica”. Aparentemente no ano 1892 ficou conhecida como “Gangrena gasosa” (Callander et al., 1938).

Em 1892, Welch e Nutall descreveram uma bactéria com capacidade de ocasionar bolhas de gás em diferentes órgãos e

tecidos, observada em um paciente que foi realizado o procedimento de necropsia, dando o nome de *Bacillus aerogenes capsulatus* (Lucey e Hutchin, 2004). No ano 1898, Veillon e Zuber, anunciam o descobrimento de uma bactéria que chamaram de *Bacillus perfringens*, com características idênticas às descritas por Welch e Nutall. Foi em 1900, quando esta bactéria foi bem definida como causadora de gangrena gasosa nos Estados Unidos (Callander et al., 1938).

Bates, (1936) médico cirurgião do hospital da Universidade de Iowa, relatou trinta e dois casos de gangrena gasosa em humanos dividido em dois períodos. O primeiro desde 1926 até 1932 e o segundo desde 1932 até 1936, ambos os períodos com dezoito pacientes cada, encontrando mortalidades de 50% e 18%, respectivamente. A totalidade dos afetados apresentou sinais clínicos da enfermidade, caracterizados por uma coloração inicial vermelha, dor, edema intenso, quando evoluía era frequente a perda da sensibilidade, contração muscular e coloração negra esverdeada, denominado como “Músculo sem vida”. O agente isolado na maioria dos casos foi o *Clostridium welchii*.

Inúmeros casos de mortalidade por gangrena gasosa foram relatados em humanos durante a Primeira Guerra Mundial. O que permitiu que os médicos pesquisadores, conhecessem o comportamento clínico da doença e conseguiram diferenciar de enfermidades similares, assim como também modificar as técnicas de diagnóstico microbiológico e ferramentas terapêuticas. Já na Segunda Guerra Mundial, existia um conhecimento melhor sobre as enfermidades clostridiais que atingiam a musculatura e subcutâneo, diagnosticando-se casos de celulite anaeróbia, gangrena gasosa e por outros agentes como miosite estreptocócica, atuando com intervenções terapêuticas diferentes, o que permitiu uma melhora na

recuperação dos indivíduos, por tanto, um menor percentual de mortalidade (Lowry e Curtis, 1947).

No Brasil, foi relatado um caso de morte aguda por mionecrose em um touro da raça Simental, de cinco anos de idade, em um rebanho de cem animais. Com histórico de vacinação polivalente para agentes clostridiais. Observaram-se na necropsia regiões de necrose na musculatura glútea superficial, masséteres e região costal, assim como também intestino delgado congesto e bolhas de gás distribuídas na superfície do fígado. Realizaram-se esfregaços dos tecidos e corados pelo método Gram, encontrou-se bastonetes Gram positivos curtos, não esporulados, grossos e alguns em cadeia. Posteriormente, foi identificado pela técnica de PCR que o agente tratava-se de *Clostridium perfringens* tipo A. Uma das justificativas do autor é que a doença apresentada no bovino foi consequência da falta do agente etiológico na composição das vacinas comerciais (Guilhardi et al., 2008).

Um estudo retrospectivo realizado no Brasil avaliou a positividade de amostras provenientes de casos suspeitos de mionecrose, fixadas em blocos de parafina, utilizando-se a técnica de imunohistoquímica. Os espécimes clínicos foram coletados de ruminantes provenientes de 13 cidades do Mato Grosso do Sul e um do Mato Grosso, sendo três de Aquidauana (9,4%), quatro de Inocência (12,5%), um de São José do Rio Claro Mato Grosso (3,1%), dois de Terenos (6,2%), um de Nova Andradida (3,1%), dez de Campo Grande (31,3%), dois de Anastácio (6,3%), um de Angélica (3,1%), um de Jaraguari (3,1%), um de Água Clara (3,1%), um de Corumbá (3,1%), um de Ivinhema (3,1%), dois de Laguna Caarapã (6,2%), um de Bodoquena (3,1%) e um de Nioaque (3,1%). Encontrando-se isoladamente *Clostridium chauvoei* e *Clostridium perfringens* tipo A. Os demais diagnósticos demonstraram associação de dois ou três agentes, sendo o

mais frequente a ocorrência de *C. septicum*, *C. chauvoei* e *C. perfringens* tipo A, esses resultados demonstram a importância que tem o *Clostridium perfringens* tipo A na gangrena gasosa dos ruminantes (Pires, 2011).

Ambos os estudos representam uma alerta para considerar o *Clostridium perfringens* tipo A como possível causador de mionecrose na pecuária nacional. Visto que hoje ele tem sido mais relacionado como causador de enterotoxemia em pequenos ruminantes e algumas outras doenças gastrintestinais, ainda não comprovadas em bovinos. Uma vez conhecida a prevalência do agente causador desta doença é preciso definir previamente as medidas para a prevenção da mesma, uma delas fazendo uso preventivo com vacinas.

### **2.3. Tratamento e profilaxia da gangrena gasosa**

No ano 1938 eram descritas diferentes alternativas de tratamentos usadas em pacientes com gangrena gasosa, alguns com maior êxito que outros, entre eles são citados: procedimentos cirúrgicos, desde incisão e retirada do material necrótico até amputação do membro, assim como também, o uso de antitoxinas contra *Clostridium welchii* e antibiótico-terapia (Synder e Kansas, 1965).

O uso de soros antitóxicos originou muita dúvida e controvérsia nos pesquisadores, quanto ao seu uso, pois, já era conhecido que a gangrena gasosa era causada por diferentes agentes etiológicos. Existia também a dificuldade para determinar a dose curativa e ou profilática, o que motivou os pesquisadores conhecerem as prevalências desses agentes para depois realizar um soro com diferentes antitoxinas, que foram usadas em humanos. Consequentemente continuaram apresentando-se casos da enfermidade, mesmo em pessoas que receberam doses do

soro antitóxico. Posteriormente foi definido que o produto utilizado devia conter pelo menos: 10.000 U.I de antitoxina Welch, 10.000 U.I de antitoxina *Vibrion septique*, 200 U.I de antitoxina *Novyi*, 200 U.I de antitoxina *Sordelli* e 25 U.I de antitoxina *Histolyticus*. Uma vez estabelecida a sua composição, determinou-se a melhor estratégia de uso, sendo utilizado como profilático quando injetado por via subcutânea por duas aplicações em tempos diferentes em pacientes saudáveis ou com aplicação diretamente nos ferimentos de pacientes acometidos (Callander et al., 1938).

A combinação das estratégias descritas anteriormente parece que foi o mais acertado quanto à prevenção, controle e tratamento da gangrena gasosa. Utilizando-se a antitoxina polivalente como profilático e caso apresentarem sintomatologia clínica, era realizado eliminação do tecido necrótico e lavagem com solução de Pilcher's, contendo alguns sulfatos, ácido acético, NaCl, álcool, formol a 40 % e água como veículo. Outros tratamentos foram descritos, como o uso de raio-X, insuflação de oxigênio nas regiões gangrenadas ou inalação do mesmo, sendo apenas o último considerado satisfatório no auxílio na recuperação dos pacientes (Callander et al., 1938).

Acreditava-se que o uso de sulfonamidas na gangrena gasosa era benéfico. Depois de ser utilizado em três pacientes com esta doença pós-traumática, e obtido a cura na totalidade dos acometidos, não foi considerado apenas a sulfonamidas como fator curativo nesses casos já que os pacientes tinham recebido doses de antitoxina polivalente. Um estudo posterior contrariou essa hipótese, inoculando pombos com *Clostridium welchii* e tratados com sulfonamidas por via oral, o que ocasionou a morte da totalidade dos animais (Owen e Thompson, 1939).

A partir da década de quarenta foram relatados estudos usando penicilina no tratamento da doença, um deles foi realizado em três pacientes com gangrena gasosa, sem terem recebido previamente qualquer tipo de antitoxina, tratados com associação de penicilina e sulfonamida, obtendo a recuperação dos afetados. Assim, demonstrou-se que a penicilina ou a sua combinação com a sulfonamida era um fator a ser considerado no tratamento da gangrena gasosa (Harris e Leviton, 1945).

#### **2.4. Vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A**

Altemeier, (1947) utilizou uma estirpe de *Clostridium welchii* (BD6K0), previamente incubado por 24 horas em seguida inoculou em pombos com a finalidade de manter a virulência do agente. Posteriormente fabricou um toxóide adicionando sulfato de amônio para inativação das toxinas e algum composto à base de alumínio para aumentar a imunogenicidade. Foram avaliados 17 grupos de cobaios, cada grupo variando entre 17 e 29 animais. Sete grupos receberam duas e nove grupos receberam três aplicações do toxóide por via subcutânea, totalizando 364 animais tratados e 274 utilizados como grupo controle. Apresentando-se diferenças na sobrevivência de grupos entre 13 e 100%.

O autor relata a dificuldade de fabricar um toxóide eficaz capaz de proteger contra a gangrena gasosa produzida pelo *Clostridium welchii*. Mesmo obtendo resultados discrepantes quando foram comparados os três toxóides realizados sob condições idênticas, os grupos que apresentaram níveis de antitoxina sanguínea maior (3, 6, 7) foram os que tiveram maior taxa de sobrevivência (100%, 70% e 95%), respectivamente. Concluiu-se então que eram necessários mais estudos para compreender a dinâmica da proteção dos imunógenos, para posterior uso em humanos (Altemeier et al., 1947).

Quase três décadas depois, Boyd e colaboradores, (1972), estudaram a eficácia de um toxóide na prevenção da gangrena gasosa em ovinos infectados experimentalmente pelo *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium perfringens* tipo A. O produto imunogênico tinha como composição uma mistura de toxóides contra a toxina alfa de *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum* e *Clostridium perfringens type A*, 2 % de hidróxido de alumínio como adjuvante e 0,1 % de timerosal como conservante, utilizando-se dose de dois ml por via subcutânea em ovinos.

Primeiramente os animais foram desafiados pela via intramuscular com uma suspensão bacteriana de *Clostridium novyi*. Vinte ovinos sobreviventes foram divididos em quatro grupos que representaram o tratamento, e oito não vacinados foram divididos nos mesmos quatro grupos, que representaram o grupo controle. Os tratados e controle foram desafiados nas semanas (43, 44, 45 e 56) após a vacinação, colocando um ml de uma cultura de *Clostridium perfringens* tipo A (CN1491) à concentração de  $3 \times 10^9$  de células vegetativas por ml em um pano de tela, formando uma área de umidade de dois centímetros, a qual foi perfurada por um projétil fazendo uso de arma de fogo, atravessando a musculatura da coxa do membro posterior direito, repetindo o procedimento na totalidade dos animais, na tentativa de simular o que acontecia em humanos na I e II Guerra Mundial. Seis ovinos do grupo controle e apenas um do grupo imunizado morreram de gangrena gasosa até quatro dias após o desafio, obtendo uma taxa de sobrevivência de 25% e 90 % respectivamente. Demonstrando a eficácia do toxóide avaliado, concluiu-se que apesar de não ter relação fisiológica entre o modelo animal estudado e o homem, este estudo elucidou alguns aspectos imunológicos e microbiológicos, fazendo uma contribuição na medicina humana para

a prevenção desta doença (Boyd et al., 1972).

Fabricar um toxóide capaz de proteger contra a gangrena gasosa produzida pela infecção do *Clostridium perfringens* tipo A não representava mais um problema naquela época. No entanto, obter uma quantidade suficiente para imunizar a totalidade dos batalhões representou a maior limitante no controle dessa enfermidade. Hoje, as pesquisas avaliando a eficácia e desenvolvimento de diferentes vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A na gangrena gasosa, não são mais direcionadas ao uso em humanos, como foi descrito anteriormente, mas sim em animais de produção, devido ao conhecimento do impacto que este ocasiona (Titball, 2009).

Na atualidade existem duas abordagens para o desenvolvimento de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A na gangrena gasosa, uma delas é a utilização de fragmentos considerados como não tóxicos da toxina alfa (Domínios) e a outra continua sendo a clássica fabricação de toxóides utilizando toxinas brutas inativadas (Titball, 2009).

Titball, (1999) usando técnicas de manipulação genética, conseguiu avaliar a eficácia de proteção de quatro tipos de imunógenos contra gangrena gasosa. Foram utilizados um toxóide clássico contra *Clostridium perfringens* tipo A e um toxóide modificado. Neste foi adicionado 10 microgramas de extrato de hidróclorido de guanadina (GST-CPA<sub>247-370</sub>), e dois grupos, nos quais a sua composição eram fusões de aminoácidos de fragmentos que representavam o Domínio – N (CPA<sub>1-249</sub>) e Domínio C terminal (CPA<sub>247-370</sub>) da toxina alfa. Utilizou-se como controle dois grupos onde não foi aplicado nenhum imunógeno. Os grupos avaliados foram representados por seis camundongos cada, apenas os vacinados foram desafiados tanto com doses de cinco a cinquenta microgramas de toxina alfa por via

intraperitoneal, e animais sob as mesmas condições com 10<sup>9</sup> células vegetativas de uma estirpe de *Clostridium perfringens* tipo A (NCTC 8237) por via intramuscular e os grupos controle foram subdivididos e inoculados com três diluições do mesmo inóculo de células vegetativas (10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>) pela mesma via. Nos grupos controle morreram a totalidade dos animais exceto os inoculados com a diluição de 10<sup>7</sup>, considerada pelo autor como dose não letal. No grupo Domínio – N (CPA<sub>1-249</sub>) morreram todos os indivíduos, no toxóide modificado morreu o 66 % dos inoculados, e nos grupos toxóide clássico e Domínio C terminal (CPA<sub>247-370</sub>) obteve-se 100 % de sobrevivência.

Um estudo posterior foi realizado, utilizando a mesma tecnologia descrita anteriormente, na qual se avaliou uma proteína recombinante como imunógeno, composta de uma fusão de aminoácidos do Domínio C terminal (CPA<sub>247-370</sub>) da toxina alfa. Utilizou-se camundongos como modelo experimental, determinando-se o percentual de sobrevivência, assim como também o efeito na função microvascular e resposta inflamatória tecidual. O desafio foi realizado com inoculação intramuscular de três doses: 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124). Obteve-se uma taxa de sobrevivência para os imunizados de 90%, 90% e 80 %; e 40%, 0% e 0% para os grupos controle nas respectivas diluições. Os grupos tratados apresentaram um menor grau de lesão muscular e trombose da microvasculatura, e maior infiltrado de células inflamatórias no local de infecção (Stevens et al., 2004).

Em ambos os trabalhos, concluiu-se que o uso do Domínio C terminal (CPA<sub>247-370</sub>) da toxina Alfa do *Clostridium perfringens* tipo A das duas estirpes ATCC 13124 e NCTC 8237, são uma estratégia viável a ser usada na prevenção da gangrena gasosa causada pelo agente estudado. Assim como também, ajuda a elucidar como o uso de



pequenos fragmentos de toxinas não tóxico induz uma resposta imunológica igual ou similar a aquela produzida por toxinas brutas inativadas. Levando uma perspectiva a futuro de fabricar um produto com combinações dessas frações não tóxicas e imunogênicas de diferentes agentes etiológicos, assim o animal sendo exposto a menores quantidades de epítomos, este teria uma melhor resposta imunológica específica, o que contribuiria na eficácia das vacinas, portanto na prevenção das doenças. Assim como também permitiria através do uso desta ferramenta, fabricar uma quantidade do produto maior em um menor tempo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Os animais foram alojados no Laboratório de soros e vacinas do Departamento de Medicina Preventiva (DMVP), as técnicas microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Anaeróbios do DMVP e as necropsias foram realizadas no Laboratório de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV).

#### 3.2. Animais utilizados

Foram utilizados um total de 98 cobaios (*Cavia porcellus*) albinas da linhagem “English short ear”, machos, com peso entre 300 e 500 gramas, os quais foram adquiridos em um biotério comercial. Desses, 50 foram utilizados para estabelecer a dose de desafio e 48 para a avaliação da eficácia das vacinas. Para estabelecimento da dose desafio, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 10 animais. Para avaliação da eficiência das vacinas testadas, formaram-se seis grupos de oito animais. Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de 25

cm de largura por 30 cm de comprimento, sendo cinco animais por caixa. Realizou-se tricotomia nos membros pélvicos, abdômen e peito, posteriormente foram pesados e identificados. Os cobaios foram alimentados com ração comercial<sup>1</sup> para cobaias e água *ad libitum*, sendo suplementadas com vitamina C a 20% na dose de 10 mg/kg, três vezes por semana até o final do experimento.

### 3.3. Obtenção dos Imunógenos

#### 3.3.1. Amostra de referência

Para reprodução experimental da mionecrose em cobaios, produção da bacterina e do toxóide utilizou-se uma amostra de referência do *American Type Culture Collection*<sup>2</sup> de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), pertencente a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG.

#### 3.3.2. Cultivo e fermentação da amostra

A amostra de *Clostridium perfringens* tipo A foi reconstituída em caldo *Brain heart infusion*<sup>3</sup> (BHI) e, após 12 horas de incubação, em jarra de anaerobiose<sup>4</sup> contendo mistura gasosa (80% N<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; e 10% H<sub>2</sub>), a 37°C, foi semeada em tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo BHI, e em duas placas com ágar Muller-Hinton<sup>4</sup> suplementado com (5% (v/v) de sangue de carneiro (AS). Os tubos e uma das placas foram incubados em anaerobiose a 37°C por 24 horas. A outra placa foi deixada em aerobiose para realização de teste respiratório avaliando a pureza da amostra. As colônias foram avaliadas visualmente e pelo método de Gram quanto á morfologia e pureza.

---

<sup>1</sup>NUVILAB CR1, Brasil

<sup>2</sup>Cewin, Brasil

<sup>3</sup>NIBISC, Inglaterra

<sup>4</sup>Difco Laboratories, EUA

A fermentação bacteriana foi realizada em três etapas: obtenção do pré-inóculo, inóculo e fermentação em biorreator de bancada (BioFlo 110)<sup>5</sup> com volume da dorna de 5,0L. O biorreator<sup>6</sup> é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, dispondo de controle de velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio que permitem manter uma atmosfera anaeróbia durante todo o ensaio. O aparelho possui um sistema automático de controle de temperatura e pH, além de permitir a colheita de alíquotas para a dosagem da concentração celular, a qual foi quantificada através da medida de densidade ótica (DO) em espectrofotômetro<sup>7</sup> a 600 nm. O meio utilizado na fermentação foi o TYG (protease de peptona (1% v/v), digestão pancreática de caseína (1% v/v), extrato de levedura (0,5% v/v), glicose (0,5% v/v), NaCl (0,5% v/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5% v/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,27% v/v), MgSO<sub>4</sub> (0,003% v/v) e cisteína (0,03% v/v) para o processo de fermentação.

O pré-inóculo em BHI foi transferido na proporção de 10% (v/v) para o meio TYG no biorreator, sob atmosfera de anaerobiose, pH 7,1 e temperatura de 36,7°C. A fermentação foi interrompida na fase estacionária de crescimento bacteriano. Após crescimento, a cultura foi centrifugada a 3.000 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante da cultura foi concentrado 32 vezes por sistema de ultrafiltração tangencial com cartucho Pellicon<sup>8</sup> com membrana de retenção de 10 kDa<sup>9</sup>. O filtrado diluído para foi armazenado a -80°C até sua utilização. O pellet total obtido foi ressuspensionado em um litro de tampão fosfato PBS 1X, realizando plaqueamento em placas de AS para posterior estimativa das unidades formadoras de colônia (Manteca, 2006).

---

<sup>5</sup>Oxoid, Inglaterra

<sup>6</sup>New Brunswick Scientific, UK

<sup>7</sup>CELM, Brasil

<sup>8</sup>Millipore Corporation, EUA

<sup>9</sup>Sardstedt, EUA

### 3.3.3. Fabricação do placebo e vacinas

A suspensão bacteriana obtida na fermentação foi novamente centrifugada a 3000 x g a 4°C, durante 30 minutos, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 15 mL de solução estéril de tampão fosfato (PBS) pH 7,2. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes, e, após a última centrifugação, utilizaram-se diferentes diluições até conseguir uma concentração de 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL) de *Clostridium perfringens* tipo A. Posteriormente foi inativada a suspensão, adicionado 0,5% de solução de formalina neutra tamponada (v/v), mantendo-a sob agitação constante, *overnight*, temperatura ambiente.

A partir do sobrenadante obtido na fermentação foi realizada dosagem proteica, utilizando-se um kit comercial<sup>10</sup>, e titulação em camundongos (Sebaldi e Petit, 1998), e posteriormente foi dividido em duas alíquotas, e uma delas foi subdividida em ependorf e congelada a -80 °C. Na outra alíquota foram adicionados 0,5 % de solução de formalina neutra tamponada (v/v) sob agitação em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.

As preparações e diluições utilizadas para a fabricação das diferentes vacinas são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Composição das vacinas avaliadas, em cobaios inoculados experimentalmente com *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular.

Vacina	Composição
Placebo	45mL PBS + 5 mL + AL (OH) <sub>3</sub>
Toxóide	45 mL TI + 45 mL PBS + 10 mL AL (OH) <sub>3</sub>
Bacterina	1 mL SB + 89 mL PBS + 10 mL AL (OH) <sub>3</sub>
Bacterina + Toxóide	1 mL SB + 89 mL PBS + 45 mL TI + 10 mL AL (OH) <sub>3</sub>
Toxóide Comercial	Toxóide de CPA maior ou igual a 0,5 UI*

**PBS:** Solução tampão salina fosfato 1x, **AL(OH)<sub>3</sub>:** Hidróxido de alumínio, **TI:** sobrenadante com toxinas inativadas, **SB:** Suspensão bacteriana inativada, (\*) Descrição na vida bula do produto.

#### 3.3.4. Controle de qualidade e inocuidade das vacinas

Para o teste de inocuidade, administrou-se 0,5 mL de cada uma das três vacinas experimentais em oito camundongos por via intraperitoneal (CFR, 2012) e dois mL em dois cobaios por via subcutânea, seguindo por uma observação de sete dias para anotação de algum tipo de alteração clínica ou morte. (Pereira, 1997).

O teste de esterilidade foi realizado semeando 0,5 mL de cada vacina experimental em quatro tubos com tampa rosca contendo 10 mL de caldo Tioglicolato, quatro placas AS e em quatro

placas Ágar batata. Metade dos cultivos foi mantida em aerobiose e a outra em anaerobiose a 37°C, por 14 dias, com leituras diárias (Pereira, 1997).

#### 3.4. Avaliação das vacinas

Avaliou-se a eficiência de quatro vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A, três delas produzidas no Laboratório de Anaeróbios do DMVP e uma delas adquirida diretamente no comércio (Tabela 2). O toxóide comercial encontrava-se dentro do prazo de validade, respeitando-se as recomendações do laboratório fabricante.

Tabela 2: Diferentes vacinas avaliadas, origem do produto fabricado e a sua composição

Vacina	Origem	Composição
Toxóide	Lab. Anaeróbios UFMG	2mg/mL PC
Bacterina	Lab. Anaeróbios UFMG	10 <sup>10</sup> UFC/mL CPA
Bacterina + Toxóide	Lab. Anaeróbios UFMG	10 <sup>10</sup> UFC/mL CPA + 2mg/mL PC
Toxóide Comercial	Laboratório comercial	CPA maior ou igual a 0,5 UI *

**CPA:** Células vegetativas de CPA, (\*) Descrição na vida bula do produto, **PC:** Proteína.

### 3.4.1. Esquema de imunização e desafio

A totalidade dos cobaios (48) foram divididos em seis grupos, administrando um mL por via subcutânea do imunógeno ou placebo no dia zero, e, no dia 21 após a primeira vacinação todos os grupos receberam um reforço ou placebo novamente (Tabela 3).

Todos os grupos avaliados, exceto o grupo Controle Negativo, foram desafiados com 0,5 mL de  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular. As inoculações foram feitas no membro pélvico direito, entre o músculo semitendíneo e semimembranoso, após desinfecção local com álcool a 70%.

Tabela 3: Esquema de imunização dos cobaios para avaliação de quatro vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A.

Vacina / Evento	Primo vacinação (dia 0)	Reforço (dia 21)	Desafio (dia 36)
Controle Negativo	Placebo	Placebo	Placebo
Controle Positivo	Placebo	Placebo	Células bacterianas
Bacterina	Células bacterianas inativadas*	Células bacterianas inativadas*	Células bacterianas
Toxóide	Toxinas inativadas **	Toxinas inativadas **	Células bacterianas
Bacterina + Toxóide	Células bacterianas inativadas***	Células bacterianas e toxinas inativadas***	Células bacterianas
Toxóide Comercial	Toxinas inativadas ****	Toxinas inativadas ****	Células bacterianas

**Placebo:** Solução tampão salina fosfato 1x, (\*): $10^{10}$  UFC/ML de *C. perfringens* tipo A.

### 3.4.2. Avaliação clínica dos cobaios inoculados

Todos os animais foram avaliados clinicamente segundo Dirksen et al., (1993), sendo realizadas algumas adaptações para cobaios (Tabela 4). Os exames clínicos

foram realizados duas horas antes da inoculação, e a cada duas horas, até 72 horas após o desafio, e tomadas em momentos considerados de maior importância, com a finalidade de linear um protocolo aplicável, tendo sido realizadas sete observações na totalidade do experimento.

Tabela 4: Alterações clínicas, escore, classificação e interpretação para avaliação clínica de cobaias imunizadas e desafiadas por *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

<b>Alteração</b>	<b>Escore</b>	<b>Classificação</b>	<b>Interpretação</b>
Edema	1	Ausente	Sem alterações no volume do local inoculado e sinal de Godet negativo
	2	Leve	Discreto aumento de volume no local de inoculação, sinal de Godet positivo (persiste por 1" a 2") e leve separação entre músculo e pele
	3	Moderado	Moderado aumento de volume no local inoculado e adjacências, sinal de Godet positivo (persiste por 3" a 4") e moderada separação entre músculo e pele
	4	Intenso	Acentuado aumento de volume em toda a coxa, sinal de Godet positivo (persiste por 5" ou mais) e acentuada separação entre músculo e pele
Extensão do edema	1	Coxa	Localizada apenas na coxa inoculada
	2	Coxa e Perna	Distribui-se pela coxa e perna do membro inoculado
	3	Coxa, perna e abdômen	Distribui-se pela coxa e perna do membro inoculado e abdômen
	4	Coxa, perna, abdômen e região do esterno	Distribui-se pela coxa e perna do membro inoculado, abdômen e região do esterno
Locomoção	1	Ausente	Sem alteração em estação e em locomoção
	2	Leve	Desconforto do animal ao se locomover, com ligeira vocalização ao elevar o membro afetado
	3	Moderado	Desconforto do animal ao se locomover, com vocalização constante quando em movimento. Animal reluta em se deslocar
	4	Intenso	Animal continuamente em estação permanece com o membro afetado

			contraído. Se movimenta apenas quando, intensamente, estimulado
Sensibilidade	1	Normal	Sem vocalização e discreta contração da musculatura em resposta a estímulos dolorosos
	2	Hipersensibilidade	Intensa resposta aos estímulos dolorosos, com vocalização constante e contração exacerbada do membro, afastando-o rapidamente
	3	Hipossensibilidade	Em resposta ao estímulo doloroso, não apresenta vocalização e tem discreta contração da musculatura, não afastando o membro afetado
	4	Ausência	Sem vocalização, ausência de contração muscular e não afasta o membro em resposta a estímulos dolorosos
Aspecto da Lesão	1	Normal	Sem alterações evidentes
	2	Edematosa	Aumentada de volume, avermelhada
	3	Gangrena úmida	Presença de bolhas, ulcerações e crostas e edema.
	4	Gangrena seca	Crostas, diminuição acentuada do volume, ausência de edema e ressecamento do membro inoculado
Tipo de Lesão	1	Edema	Aumento de volume do membro inoculado, máculas avermelhadas na pele, sinal de Godet positivo
	2	Edema e bolhas	Edema restrito à coxa; elevações circunscritas menores que 1 cm de diâmetro preenchidas por líquido esverdeado
	3	Edema, bolhas e ulcerações	Edema e bolhas restritas à coxa; bolhas se rompem formando úlceras e drenando para o exterior líquido esverdeado e fétido

	4	Crostras	Bolhas ressecadas, pele enrugada e de coloração brancacenta e esverdeada
Cor da Lesão	1	Vermelho	Coloração vermelha da pele
	2	Vermelho intenso	Coloração vermelha intensa da pele
	3	Preto	Coloração preta da pele
	4	Esverdeado	Coloração esverdeada da pele
Crepitação no músculo	1	Ausente	Ausência de crepitação no músculo à palpação
	2	Leve	Discreta crepitação no músculo à palpação
	3	Moderado	Moderada crepitação, a palpação, restrita ao local de inoculação
	4	Intenso	Crepitação no músculo e subcutâneo à palpação, se estendendo do local inoculado às áreas adjacentes

### 3.4.3. Avaliação macroscópica.

No final do período de avaliação clínica, todos os animais foram eutanasiados,

imediatamente necropsiados e as alterações encontradas foram descritas (Tabela 5).

Tabela 5: Alterações macroscópicas, escore, classificação e interpretação para avaliação clínica de cobaias imunizadas e desafiadas por *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

<b>Alteração</b>	<b>Escore</b>	<b>Classificação</b>	<b>Interpretação</b>
Aumento de volume do membro inoculado	1	Normal	Sem alterações
	2	Leve	Aumento de volume menor que dois cm e restrito ao local da inoculação
	3	Moderado	Aumento de volume da totalidade da musculatura do coxa inoculada
	4	Intenso	Aumento de volume da totalidade da musculatura da coxa e panturrilha do membro inoculado
Cor do membro inoculado	1	Normal	Sem alterações
	2	Vermelho	Coloração avermelhada da musculatura no local da inoculação
	3	Vermelho intenso	Coloração vermelha intensa a vermelha escura da musculatura no local da inoculação e regiões adjacentes
	4	Esverdeado	Coloração azul esverdeada na musculatura do local inoculado e regiões adjacentes
Bolhas e ulcerações na pele	1	Ausente	Sem alterações
	2	Leve	Presença de elevações circunscritas ou depressões irregulares na pele maiores que 2 cm, escuras, com líquido no interior ou secas e restritas ao local da inoculação
	3	Moderado	Presença de elevações circunscritas ou depressões irregulares, maiores que 2 cm, escuras, com líquido no interior ou secas multifocais na pele da coxa inoculada
	4	Intenso	Presença de elevações circunscritas ou depressões irregulares, maiores a 2 cm, escuras, com líquido no interior ou secas distribuídas na pele da coxa inoculada, abdômen e região do esterno



Percentual de lesão no membro inoculado	1	0	Estruturas musculares conservadas
	2	Menor de 30 %	Distribuição focal
	3	30 - 60 %	Distribuição multifocal
	4	Maior de 60 %	Distribuição multifocal a coalescente
Hemorragia na musculatura do membro inoculado	1	Normal	Sem alterações
	2	Leve	Presença de petéquias distribuídas na musculatura do membro inoculado, restritas ao local da inoculação
	3	Moderada	Presença de equimoses com distribuição local extensiva
	4	Intensa	Presença de sufusões distribuídas difusamente na musculatura da coxa
Edema no tecido subcutâneo e fâscias	1	Ausente	Sem alterações
	2	Leve	Presença leve de líquido gelatinoso, translúcido e amarelado ou avermelhado, de consistência macia de distribuição focal
	3	Moderado	Presença leve de líquido gelatinoso, translúcido e amarelado ou avermelhado, de distribuição localmente extensiva
	4	Intenso	Presença leve de líquido gelatinoso translúcido amarelado ou avermelhado, de distribuição difusa
Necrose de coagulação	1	Ausente	Sem alteração
	2	Leve	Áreas focais indicativas de necrose muscular
	3	Moderado	Áreas multifocais indicativas de necrose muscular
	4	Intenso	Áreas multifocais a coalescentes indicativas de necrose muscular
Necrose de liquefação	1	Ausente	Sem alteração
	2	Leve	Aspecto liquefeito da musculatura restrita ao ponto de inoculação
	3	Moderada	Aspecto liquefeito da musculatura difusamente distribuída do músculo inoculado
	4	Intensa	Aspecto liquefeito da musculatura multifocal mente distribuída no membro inoculado, regiões adjacente e/ou abdômen
Distribuição da	1	Ausente	Sem alteração

necrose de liquefação	2	Leve	Restrita ao local inoculado
	3	Moderado	Local inoculado e adjacências, mais de 1 cm
	4	Intenso	Totalidade da musculatura da coxa inoculada
Hemorragia no membro contralateral	1	Ausente	Sem alterações
	2	Leve	Presença de petéquias distribuídas na musculatura do membro inoculado, restritas ao local da inoculação
	3	Moderado	Presença de equimoses com distribuição local extensiva
	4	Intenso	Presença de sufusões distribuídas difusamente na musculatura da coxa

#### 3.4.4. Determinação do escore clínico e macroscópico.

Os escores clínico e macroscópico foram realizados somando os valores dos parâmetros avaliados. Sendo no escore clínico: edema e sua extensão, locomoção, sensibilidade, aspecto, tipo e cor da lesão, assim como também, a presença de gás no músculo; e no escore macroscópico: aumento de volume do membro inoculado (AVMI), cor do membro inoculado (CMI), bolhas e ulcerações (BEU), percentual de lesão do membro inoculado (PMI), hemorragia (HEM), edema (EDEM), necrose de coagulação (NEC), necrose de liquefação (NECL), distribuição da necrose de liquefação (PNECL) e hemorragia no membro contralateral (HEMC).

Os dados das mensurações dos membros pélvicos foram analisados pela estatística paramétrica e submetidos à análise de variância, e as medias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade(Sampaio, 1998).

### 3.5. Análises estatísticas

Os dados de avaliação de escores de alterações clínicas e macroscópicas foram analisados pela estatística não paramétrica submetidos ao teste Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação da dose para o desafio

A determinação da dose infectante de *Clostridium perfringens* tipo A para desafio dos animais imunizados foi realizada, procurando uma contagem de células bacterianas capaz de causar lesões características da doença, porém preservando a vida dos animais. Para tanto, utilizou-se diferentes concentrações bacterianas, variando de  $10^5$  até  $10^9$  UFC/mL de células vegetativas de *C.perfringens* tipo A.

Tabela 6 Concentrações bacterianas do inóculo, presença de lesão muscular, sobrevivência e mortalidade em 50 cobaios (*Cavia porcellus*) inoculados com cinco concentrações de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular.

Grupo	Inóculo	Lesão Muscular	Sobrevivência	Mortalidade
1	$10^9$	10/10	2/10	8/10
2	$10^8$	10/10	6/10	4/10
3	$10^7$	10/10	10/10	0 / 10
4	$10^6$	0 / 10	10/10	0 / 10
5	$10^5$	0 / 10	10/10	0 / 10
TOTAL	-	30 / 50	38 / 50	12/50

Os cobaios com lesão muscular apresentaram aumento de volume do membro inoculado, edema intenso, se estendendo desde o local inoculado até o peito, alteração na coloração normal da pele do membro inoculado, variando de vermelha intensa até esverdeada, sensibilidade dolorosa nas primeiras horas após o desafio progredindo para perda da mesma com o passar do tempo e alteração na locomoção, caracterizada por claudicação de elevação. Os mesmos sinais clínicos foram relatados por Pires, (2011), quando inoculou  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A em cobaios pela via intramuscular.

No grupo de cobaios inoculados com concentração bacteriana de  $10^9$  UFC/ mL obteve-se morbidade de 100% e mortalidade de 80%. Com a dose de  $10^8$  UFC/ mL, registrou-se 100% de morbidade e 40% de mortalidade, enquanto que, no grupo inoculado com dose de  $10^7$  UFC/ mL encontrou-se morbidade de 100% e mortalidade de 0%. Nos grupos de cobaios inoculados com doses de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/ mL não evidenciaram-se alterações clínicas nem macroscópicas. As doses avaliadas para padronização do desafio e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Resultados similares foram obtidos por Williamson e Titball (1993), que avaliaram a eficácia de uma vacina, produzida a partir da proteína recombinante da toxina alfa do *C. perfringens*, contra gangrena gasosa por *C. perfringens* tipo A em camundongos. Na concentração bacteriana de  $10^7$  UFC/ mL não observaram morte dos animais, no entanto, nos grupos que foram utilizadas doses maiores de  $10^8$  UFC/ mL e  $10^9$  UFC/ mL observou-se 100% de mortalidade.

Sabendo-se que o objetivo principal do estudo foi o desenvolvimento de um modelo animal para testar a eficiência de diferentes vacinas, avaliando-se escores clínicos e macroscópicos de lesão muscular, foi indispensável a utilização de dose de

desafio que garantisse 100 % de morbidade e o mínimo de mortalidade. Portanto, utilizou-se a dose de desafio de  $10^7$  UFC/mL de *Clostridium perfringens* tipo A.

#### 4.2. Resultados dos desafios dos animais imunizados

##### 4.2.1. Caracterização clínica da doença

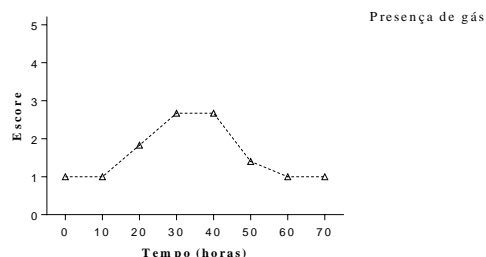
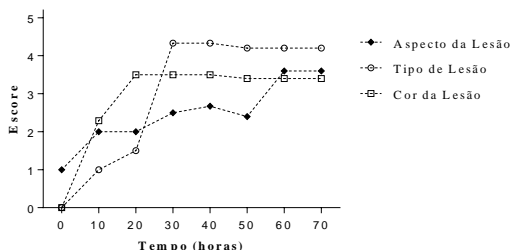
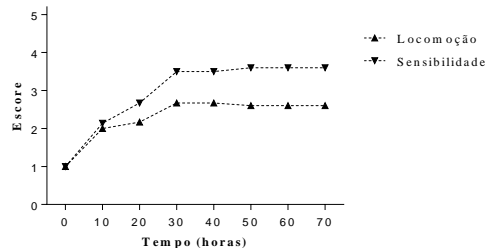
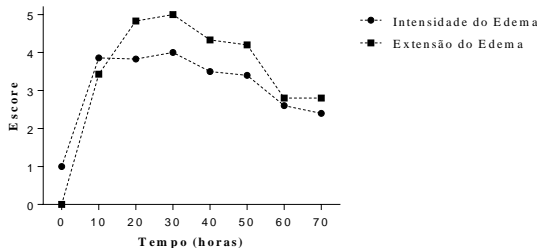
Na Tabela 7 e Gráfico 1 são descritas as alterações clínicas dos animais não imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/mL *C. perfringens* tipo A (grupo Controle Positivo), pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações. As alterações clínicas constatadas neste grupo são utilizadas como padrão, ou modelo, das lesões que acontecem na doença e, assim, pode-se comparar com os outros grupos avaliados.

Tabela 7: Escores de Locomoção, Sensibilidade, Edema, Aspecto da lesão, Extensão do edema, Tipo de lesão, Cor da lesão, Presença de gás no músculo e Escore clínico total dos cobaios (*Cavia porcellus*) do grupo controle Positivo, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  unidades formadoras de colônias/mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Parâmetro	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Locomoção	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,17 <sup>B</sup>	2,67 <sup>B</sup>	2,67 <sup>B</sup>	2,6 <sup>B</sup>	2,6 <sup>B</sup>	2,60 <sup>B</sup>
Sensibilidade	1,00 <sup>A</sup>	2,14 <sup>B</sup>	2,67 <sup>BC</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,60 <sup>C</sup>	3,60 <sup>C</sup>	3,60 <sup>C</sup>
Edema	1,00 <sup>A</sup>	3,86 <sup>CD</sup>	3,83 <sup>CD</sup>	4,00 <sup>D</sup>	3,50 <sup>BCD</sup>	3,40 <sup>BCD</sup>	2,60 <sup>ABC</sup>	2,40 <sup>AB</sup>
Aspecto da Lesão	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,50 <sup>BC</sup>	2,67 <sup>BC</sup>	2,40 <sup>BC</sup>	3,60 <sup>C</sup>	3,60 <sup>C</sup>
Extensão do Edema	0,00 <sup>A</sup>	3,43 <sup>CD</sup>	4,83 <sup>C</sup>	5,00 <sup>D</sup>	4,33 <sup>C</sup>	4,20 <sup>C</sup>	2,80 <sup>BC</sup>	2,80 <sup>BC</sup>
Tipo de Lesão	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	4,33 <sup>C</sup>	4,33 <sup>C</sup>	4,20 <sup>BC</sup>	4,20 <sup>BC</sup>	4,20 <sup>BC</sup>
Cor da Lesão	0,00 <sup>A</sup>	2,29 <sup>B</sup>	3,50 <sup>B</sup>	3,50 <sup>B</sup>	3,50 <sup>B</sup>	3,40 <sup>B</sup>	3,40 <sup>B</sup>	3,40 <sup>B</sup>
Presença de Gás	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,83 <sup>AB</sup>	2,67 <sup>B</sup>	2,67 <sup>B</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
ESCORE TOTAL	5,00	17,72	22,33	28,17	27,17	25,20	23,80	23,60

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$ .

Gráfico 1: Comportamento dos Escores de Intensidade e Extensão do Edema, Locomoção e Sensibilidade, Aspecto, Tipo e Cor da Lesão, Presença de Gás no Músculos dos cobaios (*Cavia porcellus*) do grupo controle Positivo, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  unidades formadoras de colônias/mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



#### 4.2.1.1. Intensidade e extensão do edema

Nos cobaios do grupo controle positivo observou-se edema, de diferentes graus, a partir das primeiras duas horas após a inoculação até o final do experimento. Duas horas após a inoculação, encontrou-se edema discreto, caracterizado por leve aumento de volume no local inoculado, discreto Sinal de Godet positivo (com o dedo, pressiona-se a pele do animal e observa-se a permanência da impressão do dígito), sugerindo uma separação entre músculo e pele e a presença de líquido entre ambos os tecidos. Nas horas 10 e 20, houve aumento significativo do edema que passou a ser moderado e se estendeu do local de inoculação, caudalmente, até a perna e, cranialmente, até o abdômen. Na hora 30, o edema se estendeu também para a região do esterno e, nos tempos seguintes, a extensão do edema se comportou como nas horas 10 e 20. O edema atingiu o escore máximo na hora 30 após o desafio, quando se observou intenso aumento de tamanho do membro inoculado, observou-se presença abundante

de líquido flutuante, à palpação direta, que criou um grande espaço entre a musculatura e a pele, e deixou uma marcada impressão digital (Sinal de Godet positivo), sendo, portanto, denominado como edema de grau intenso. Esta alteração clínica apresentou diminuição, estatisticamente significativa, na hora 40, seguida por diminuição na hora 50. Já na hora 60 e 70, evidenciou-se uma diminuição drástica, estatisticamente significativa, da intensidade do edema que passou a ser classificado como moderado, além de, observar-se mudança na distribuição do mesmo, encontrando-se apenas na coxa inoculada e panturrilha do membro ipsolateral.

#### 4.2.1.2. Locomoção e sensibilidade

Ao avaliar a locomoção dos animais inoculados, evidenciou-se alteração 10 horas após o desafio, caracterizada por dificuldade de locomoção. Os cobaios mantinham-se mais tempo em estação e, quando se locomoviam, apresentavam marcado desconforto, principalmente quando elevavam o membro inoculado.

Esta alteração foi mais evidente quando os cobaios eram expostos a superfícies brandas, como serragem, sendo pouco notada quando colocados em superfícies duras, denotando uma claudicação de elevação. Esta alteração foi classificada como leve na hora 10 após o desafio, e, a partir da hora 20, foi moderada, estabilizando-se para esse escore até o final das observações.

A sensibilidade também apresentou diferenças desde duas até 10 horas após o desafio. À palpação ou estímulo com agulha fina do membro inoculado, observaram-se nos animais marcado desconforto, vocalizações e contrações da musculatura avaliada, sugerindo uma resposta dolorosa por parte do animal frente ao estímulo, denominada, então, como hipersensibilidade. Vinte horas após o desafio, quando foi estimulado o local da inoculação e suas adjacências, os animais diminuíram as vocalizações e contrações da musculatura, reagindo de maneira mais leve, o que demonstra que os animais ainda preservavam a sensibilidade, porém, esta se encontrava diminuída, denominando-a como hipossensibilidade. A partir da hora 40 até o final das avaliações, os animais não apresentaram vocalizações, não contraíam a musculatura e não demonstraram nenhum tipo de resposta sensitiva tanto à palpação como na utilização da agulha, denotando uma ausência da sensibilidade nesses momentos avaliados.

#### **4.2.1.3. Aspecto, tipo e cor da lesão**

O cobaios do grupo Controle Positivo apresentaram aspecto e cor da lesão variável ao longo do experimento, sendo que, das duas até 20 horas após a inoculação, a característica da pele no local da inoculação tornou-se lisa, brilhante, vermelha, denotando aspecto edematoso. Desde a hora 30 até hora 50 ocorreram certas mudanças no aspecto da lesão, evidenciando-se, além do edema, formação

de bolhas esverdeadas com uma camada externa fina na epiderme, coloração esverdeada, também, na pele, acompanhando as regiões edemaciadas, inclusive até a região do esterno, em todos os momentos avaliados. As bolhas presentes no membro inoculado romperam facilmente poucas horas após a sua formação, liberando líquido verde escuro, fétido, formando fístulas que comunicavam a pele com a musculatura da coxa. Posteriormente, observou-se que, no local de instalação das fístulas, a pele ficou enrugada e houve a formação de crostas, denominando este aspecto encontrado, na totalidade do período, como “gangrena úmida”. Da hora 60 até a hora 70, uma última mudança foi encontrada, os membros inoculados apresentaram rápida perda de líquido, porém sem exteriorização de líquidos ou fluidos, encontrando-se bastante diminuídos de volume, com aparência de desidratados e conservando a coloração esverdeada com numerosas regiões brancacentas, denominando-se, então, este aspecto como “gangrena seca”.

Pelas alterações descritas anteriormente, observou-se que, ao início do experimento (duas horas após o desafio), os animais apresentaram edema de grau leve, com distribuição restrita ao local da inoculação, hipersensibilidade e alteração da locomoção. Em seguida, houve aumento do grau do edema e da sua extensão, contudo, mantendo a hipersensibilidade e o escore de claudicação. A formação de bolhas, ulcerações e crostas na epiderme acompanharam a hipossensibilidade e coloração esverdeada tanto no membro inoculado como nas regiões adjacentes. Finalmente, ocorreu progressão da claudicação, total perda da sensibilidade, regressão do edema e mumificação do membro afetado. Apesar de não se constar diagnóstico histopatológico que demonstre a morte celular estabelecida nos tecidos, pode-se inferir, a partir da descrição clínica e do conhecimento prévio da ação

histotóxica do *C. perfringens* tipo A inoculado nos cobaias, que esses animais apresentaram um quadro inicial de inflamação com posterior comprometimento vascular, que originou uma lesão possivelmente irreversível,

levando à morte celular e necrose, processo patológico conhecido como gangrena ou mionecrose.



**Figura 1: Alterações clínicas observadas em cobaios não imunizados e desafiados com células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124).** (1) Leve aumento de volume do membro inoculado com coloração levemente avermelhada. (2) Sinal de Godet positivo. (3) Moderado aumento de volume do membro inoculado, com áreas focais de coloração verde escura no local inoculado e suas adjacências, com regiões vermelhas intensas na periferia, fistulando líquido amarronzado. (4) Acentuado aumento de volume do membro inoculado, com regiões de cor esverdeada e outras vermelha intensa. (5 e 6) Acentuado aumento de volume no subcutâneo na regiões de declive (abdominal e esternal).





**Figura 2: Progressão das lesões macroscópicas observadas em cobaios não imunizados e desafiados com células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo AA (ATCC 13124).** (1) Pele da fase lateral da coxa com região maior a um cm, úmida, alopécica de bordas avermelhadas, restrita ao local de inoculação. (2) Pele da face lateral da coxa com região maior a um cm, úmida, vermelho-escura, restrito ao local de inoculação, fistulando líquido amarronzado. (3) Acentuado aumento de volume do membro inoculado, com secreção de

líquido amarronzado, perda da integridade da pele, coloração da pele do membro inoculado, o abdômen e região do esterno esverdeada e vermelha. (4) Pele lateral da coxa: área verde-escura, bem delimitada, atingindo quase a totalidade do membro inoculado. (5) Lesão circunscrita, maior de 1 cm, lisa, alopecica, de coloração brancacenta, no local da inoculação. (6) Lesão escura, enrugada na epiderme, de aspecto seco crostoso, distribuída em quase a totalidade do membro inoculado.

#### 4.2.2. Avaliação clínica por parâmetros

seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

##### 4.2.2.1. Locomoção

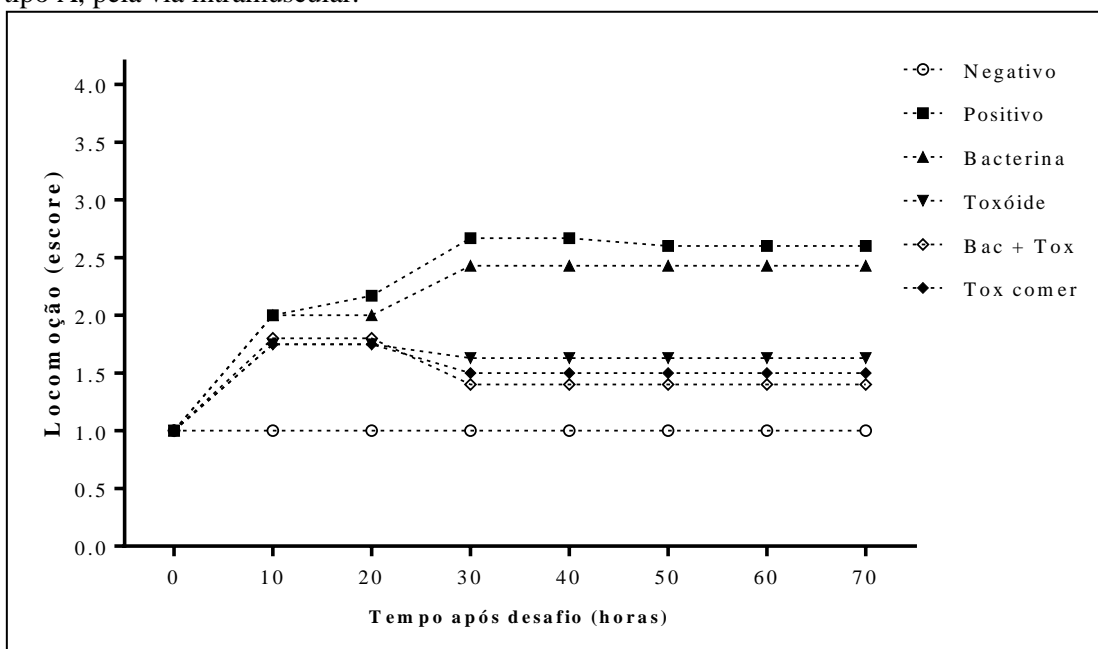
Na Tabela 8 e Gráfico 2 são descritas as alterações da locomoção encontradas nos

Tabela 8 Escore de Locomoção dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  unidades formadoras de colônias/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,17 <sup>B</sup>	2,67 <sup>C</sup>	2,67 <sup>C</sup>	2,60 <sup>B</sup>	2,60 <sup>B</sup>	2,60 <sup>B</sup>
Bacterina	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,43 <sup>BC</sup>	2,43 <sup>BC</sup>	2,43 <sup>B</sup>	2,43 <sup>B</sup>	2,43 <sup>B</sup>
Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,63 <sup>A</sup>	1,63 <sup>AB</sup>
Bacterina+Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,80 <sup>B</sup>	1,80 <sup>B</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>
Toxóide Comercial	1,00 <sup>A</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	1,50 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$ .

Gráfico 2: Comportamento do Escore de locomoção dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Em todos os grupos, exceto para o controle negativo, observou-se alteração da locomoção, caracterizada por claudicação de elevação, a partir das quatro horas até 20 horas após o desafio, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados ao grupo Controle Positivo. Na hora 30 e 40 após o desafio, os grupos Controle Positivo, e Bacterina apresentaram escores de claudicação superiores aos observados nos outros grupos. A partir da hora 30, o escore de claudicação, dentro de cada grupo, manteve-se uniforme até o término do tempo de avaliação. Nestes momentos os grupos Toxóide e Toxóide comercial se

comportaram semelhantes ao Controle negativo.

#### 4.2.2.2. Sensibilidade

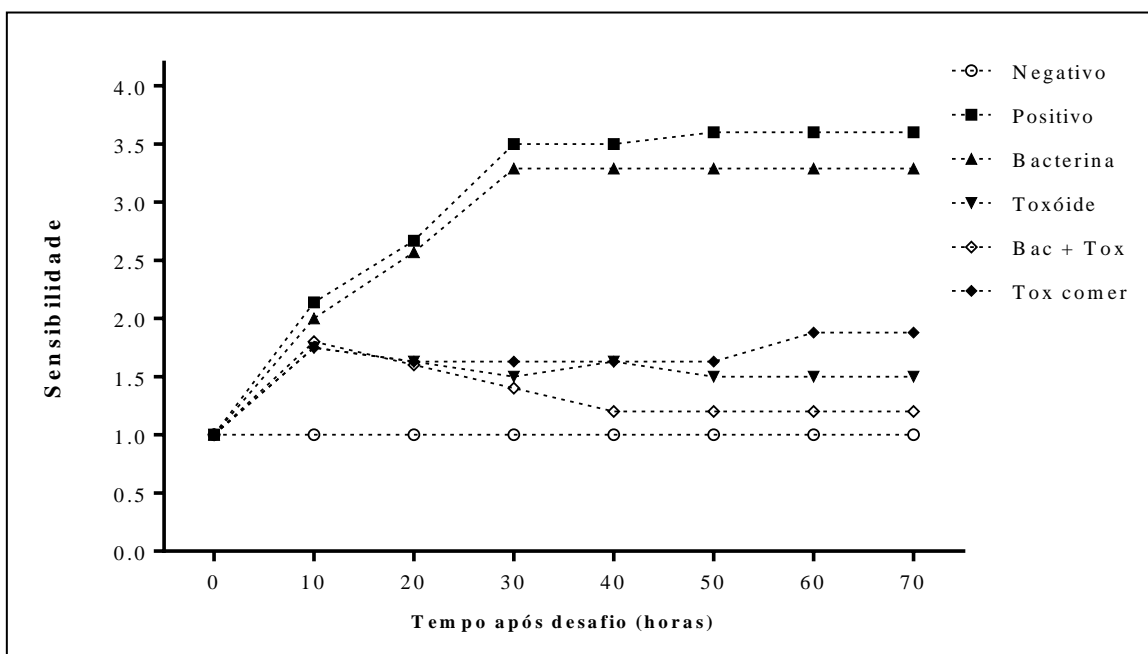
Na Tabela 9 e Gráfico 3 são descritas as alterações da sensibilidade encontradas nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

Tabela 9 Escore de Sensibilidade dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	1,00 <sup>A</sup>	2,14 <sup>B</sup>	2,67 <sup>B</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,60 <sup>C</sup>	3,60 <sup>B</sup>	3,60 <sup>B</sup>
Bacterina	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,57 <sup>B</sup>	3,29 <sup>BC</sup>	3,29 <sup>BC</sup>	3,29 <sup>BC</sup>	3,29 <sup>B</sup>	3,29 <sup>B</sup>
Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,63 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,63 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,50 <sup>A</sup>
Bacterina+Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,80 <sup>B</sup>	1,60 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>
Toxóide Comercial	1,00 <sup>A</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,63 <sup>A</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,88 <sup>AB</sup>	1,88 <sup>AB</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 3 Comportamento do Escore de Sensibilidade dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Observou-se alteração da sensibilidade, caracterizada por hipersensibilidade, a partir das quatro horas até 10 horas após o desafio, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados

ao grupo Controle Positivo. Na hora 20 após o desafio, os grupos Controle Positivo e Bacterina apresentaram escores de sensibilidade superiores aos observados nos outros grupos, caracterizada por hipossensibilidade. A partir da hora 30, o

escore de sensibilidade aumentou novamente nos grupos Controle Positivo e Bacterina, caracterizada por ausência da sensibilidade, e manteve-se uniforme até o término do tempo de avaliação. A partir de 20 horas após o desafio os grupos Toxóide, Bacterina + Toxóide e Toxóide comercial se comportaram semelhante ao controle negativo.

#### 4.2.2.3. Edema

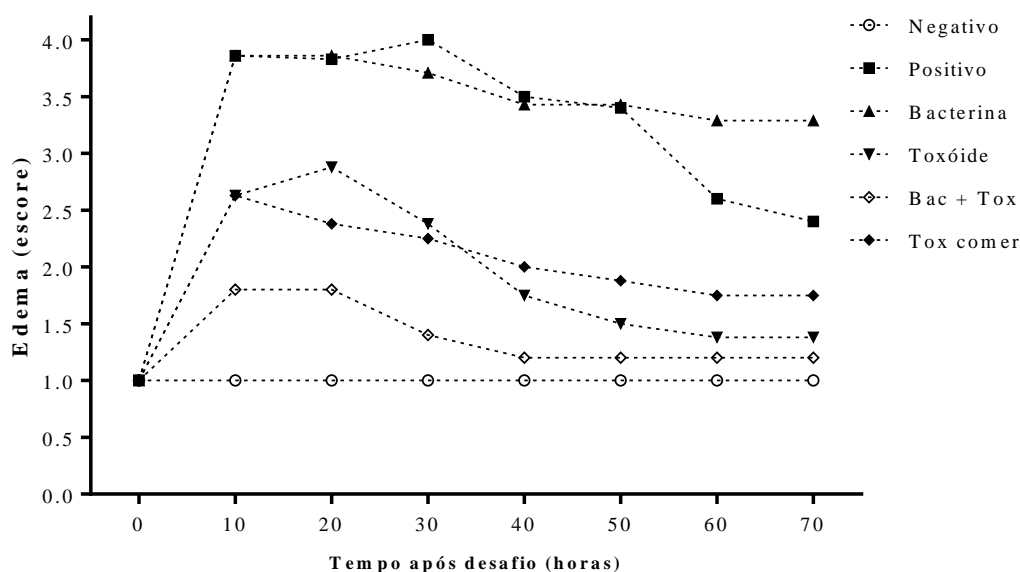
Na Tabela 10 e Gráfico 4 são descritas as intensidades do edema encontradas nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

Tabela 10 Escore de Edema dos cobaias (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	1,00 <sup>A</sup>	3,86 <sup>C</sup>	3,83 <sup>C</sup>	4,00 <sup>D</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,40 <sup>B</sup>	2,60 <sup>B</sup>	2,40 <sup>B</sup>
Bacterina	1,00 <sup>A</sup>	3,86 <sup>C</sup>	3,86 <sup>C</sup>	3,71 <sup>CD</sup>	3,43 <sup>C</sup>	3,43 <sup>B</sup>	3,29 <sup>B</sup>	3,29 <sup>B</sup>
Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	2,63 <sup>B</sup>	2,88 <sup>BC</sup>	2,38 <sup>BC</sup>	1,75 <sup>AB</sup>	1,50 <sup>A</sup>	1,38 <sup>A</sup>	1,38 <sup>A</sup>
Bacterina+Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,80 <sup>AB</sup>	1,80 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	1,20 <sup>AB</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,20 <sup>A</sup>
Toxóide Comercial	1,00 <sup>A</sup>	2,63 <sup>B</sup>	2,38 <sup>B</sup>	2,25 <sup>BC</sup>	2,00 <sup>BC</sup>	1,88 <sup>AB</sup>	1,75 <sup>AB</sup>	1,75 <sup>AB</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 4 Comportamento do Escore de Edema dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Observou-se Edema, a partir das 10 horas após a inoculação, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo, sendo que os grupos Controle Positivo e Bacterina apresentaram o escore mais elevado e, estatisticamente diferente do escore dos outros grupos. Apesar de ter sido observado edema no grupo Bacterina + Toxóide, este não foi considerado estatisticamente diferente do escore do Controle Negativo, comportando-se desta forma ao longo de todos os períodos avaliados.

Na hora 20, o escore de edema do grupo Toxóide se elevou, igualando aos escores obtidos no Controle Positivo e Bacterina. Na hora 30, o escore do grupo Toxóide regrediu, enquanto os grupos Controle Positivo e Bacterina mantiveram escores de Edema superiores. Da hora 40 até a hora 70,

os escores dos grupos Controle Positivo e Bacterina, regrediram e se igualaram, estatisticamente, ao escore do grupo Toxóide Comercial. O grupo Toxóide apresentou, na hora 30, escore de Edema significativamente superior ao escore do Controle Negativo. No entanto, o escore do grupo Toxóide regrediu, na hora 40, se igualando ao grupo Controle Negativo.

#### 4.2.2.4. Aspecto da lesão

Na Tabela 11 e Gráfico 5 são descritos os aspectos das lesões encontradas nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

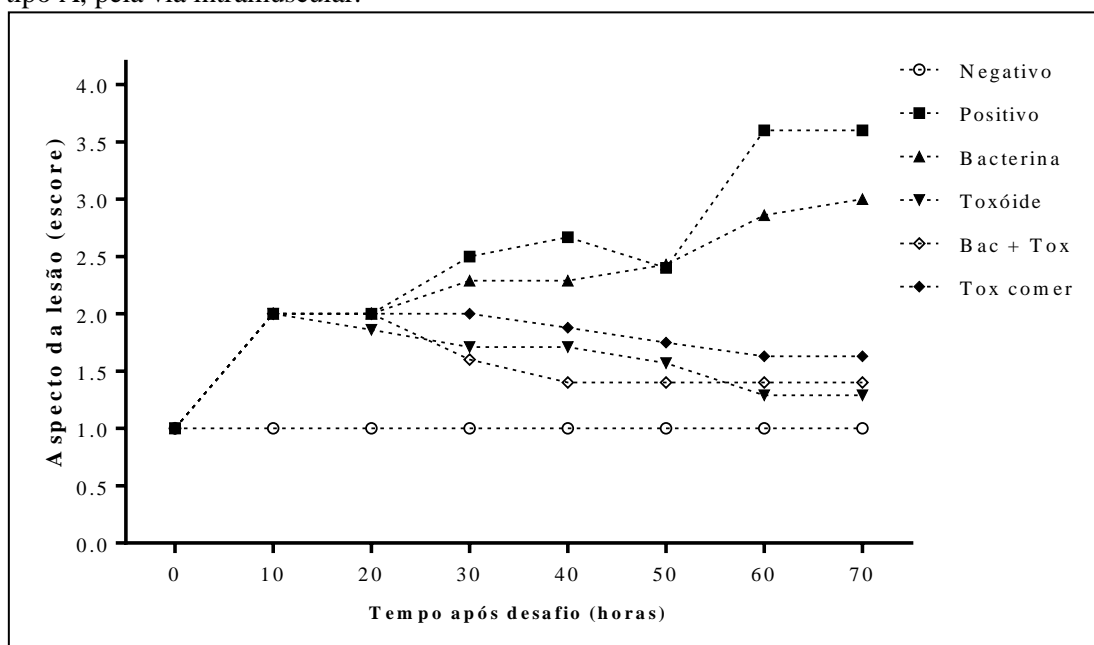
Tabela 11: Escore Aspecto da Lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora
-------	------

	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,50 <sup>B</sup>	2,67 <sup>C</sup>	2,40 <sup>CD</sup>	3,60 <sup>B</sup>	3,60 <sup>B</sup>
Bacterina	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,29 <sup>B</sup>	2,29 <sup>C</sup>	2,43 <sup>D</sup>	2,86 <sup>B</sup>	3,00 <sup>B</sup>
Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,71 <sup>B</sup>	1,71 <sup>BC</sup>	1,57 <sup>ABC</sup>	1,29 <sup>A</sup>	1,29 <sup>A</sup>
Bacterina+Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	1,60 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>A</sup>	1,40 <sup>A</sup>
Toxóide Comercial	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,00 <sup>B</sup>	1,88 <sup>BC</sup>	1,57 <sup>BCD</sup>	1,63 <sup>A</sup>	1,63 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$ .

Gráfico 5: Comportamento do Escore Aspecto de Lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Observou-se lesão com aspecto edematoso, a partir das quatro horas até 20 horas após o desafio, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados ao grupo Controle Positivo. Na hora 30, apesar de ter sido observado aspecto

edematoso no membro inoculado do grupo Bacterina + Toxóide, este não foi considerado estatisticamente diferente do escore do Controle Negativo, comportando-se desta forma no restante dos períodos avaliados. Da hora 30 até a hora 50 após o desafio, observou-se nos grupos Controle

Positivo, Bacterina, Toxóide e Toxóide comercial escores maiores ao comparados com o grupo Controle Negativo, caracterizado, além do edema, por bolhas na pele, que progrediram até formação de crostas, apesar de encontrarem-se graus variáveis desta lesão entre os grupos afetados, não se encontrou diferença estatisticamente significativa. A partir da hora 60 após a inoculação, evidenciou-se um aumento dos escores nos grupos Controle Positivo e Bacterina, caracterizado por aspecto mumificado, e manteve-se até o término do tempo de avaliação. No mesmo

período os grupos Toxóide e Toxóide comercial, igualaram o escore do grupo Controle Negativo.

#### 4.2.2.5. Extensão do edema

Na Tabela 12 e Gráfico 6 são descritos os diferentes graus de extensão escore do edema encontradas nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

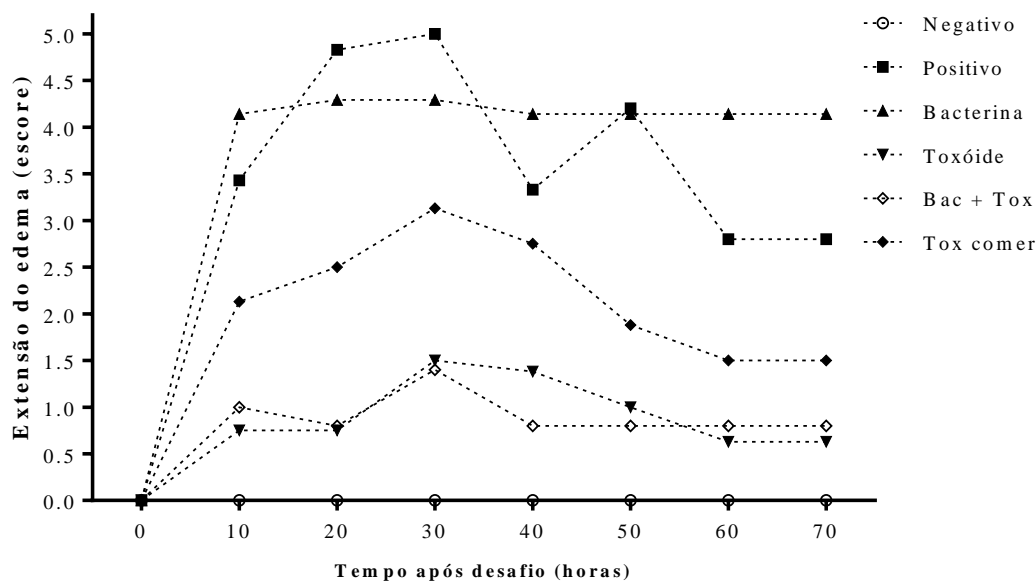
Tabela 12: Escore Extensão do Edema dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	0,00 <sup>A</sup>	3,43 <sup>CD</sup>	4,83 <sup>C</sup>	5,00 <sup>D</sup>	4,33 <sup>C</sup>	4,20 <sup>C</sup>	2,80 <sup>BC</sup>	2,80 <sup>BC</sup>
Bacterina	0,00 <sup>A</sup>	4,14 <sup>D</sup>	4,29 <sup>C</sup>	4,29 <sup>CD</sup>	4,14 <sup>C</sup>	4,14 <sup>C</sup>	4,14 <sup>C</sup>	4,14 <sup>C</sup>
Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	0,75 <sup>AB</sup>	0,75 <sup>AB</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	1,38 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>AB</sup>	0,63 <sup>AB</sup>	0,63 <sup>AB</sup>
Bacterina+Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>ABC</sup>	0,80 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	0,80 <sup>AB</sup>	0,80 <sup>AB</sup>	0,80 <sup>AB</sup>	0,80 <sup>AB</sup>
Toxóide Comercial	0,00 <sup>A</sup>	2,13 <sup>BCD</sup>	2,50 <sup>BC</sup>	3,13 <sup>BC</sup>	2,75 <sup>BC</sup>	1,88 <sup>BC</sup>	1,50 <sup>B</sup>	1,50 <sup>B</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 6: Comportamento do Escore Extensão do Edema dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.





Observou-se edema no local inoculado, a partir da hora quatro até a hora 10 após o desafio, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo. Da hora 10 até a hora 20, apesar de observar-se nos grupo Toxóide e Bacterina + Toxóide a presença de edema no local inoculado, não foram encontradas diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo Controle Negativo, mantendo-se este comportamento ao longo das avaliações. No entanto, os grupos Controle Positivo, Bacterina e Toxóide comercial apresentaram escores de extensão do edema superiores, quando comparados com o Controle Negativo, caracterizado por se estender na região da panturrilha, coxa inoculada, abdômen e peito. Na hora 30, o escore do grupo Toxóide regrediu,

apresentando diferenças estatísticas, tanto para o grupo Controle Positivo como para o Controle Negativo. Na hora 40 os grupos Controle Positivo e Bacterina diminuíram o escore, não se observando edema na região do peito, igualando o escore do grupo Toxóide Comercial, mantendo-se este comportamento até o final das avaliações.

#### 4.2.2.6. Tipo de Lesão

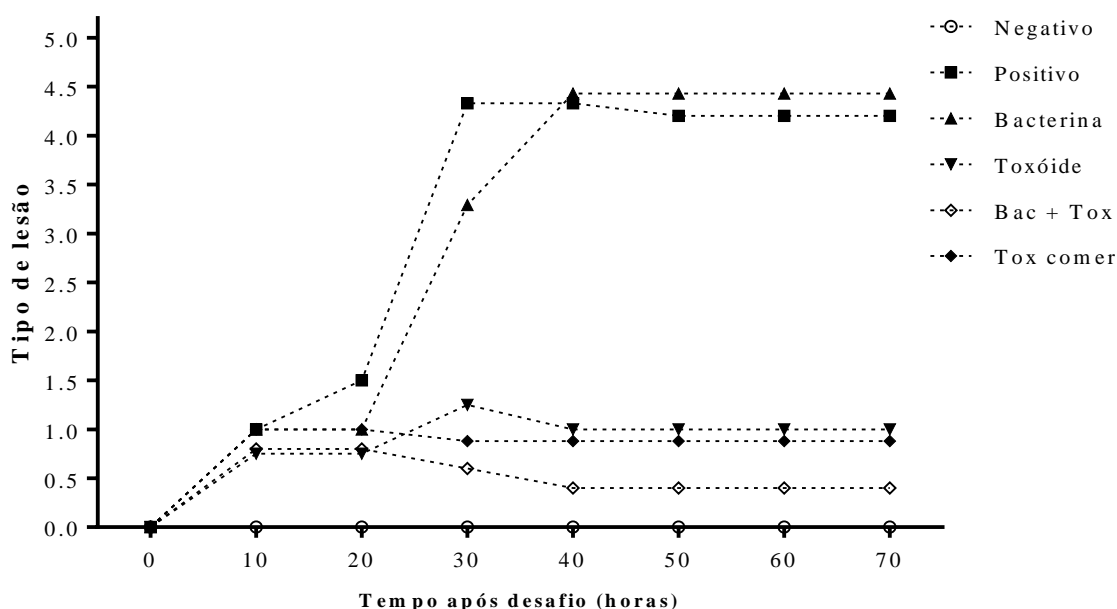
Na Tabela 13 e Gráfico 7 são descritas os diferentes tipos de lesão encontrados nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

Tabela 13: Escore Tipo de Lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,50 <sup>B</sup>	4,33 <sup>D</sup>	4,33 <sup>CD</sup>	4,20 <sup>CD</sup>	4,20 <sup>CD</sup>	4,20 <sup>CD</sup>
Bacterina	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	3,29 <sup>CD</sup>	4,43 <sup>D</sup>	4,43 <sup>D</sup>	4,43 <sup>D</sup>	4,43 <sup>D</sup>
Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	0,75 <sup>B</sup>	2,75 <sup>B</sup>	1,25 <sup>BC</sup>	1,00 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>AB</sup>
Bacterina+Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	0,80 <sup>B</sup>	0,80 <sup>B</sup>	0,60 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>AB</sup>
Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	0,88 <sup>BC</sup>	0,88 <sup>BC</sup>	0,88 <sup>BC</sup>	0,88 <sup>BC</sup>	0,88 <sup>BC</sup>
Comercial								

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 7: Comportamento do Tipo da Lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Observou-se edema, a partir de quatro horas até 20 horas após o desafio, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados ao grupo Controle Positivo. Da

hora 30 após o desafio, os grupos Controle Positivo e Bacterina, apresentaram um aumento do escore, caracterizado pela aparição de bolhas, úlceras e crostas, o que se manteve até o final das avaliações.

Apesar de se evidenciarem as mesmas lesões, em graus muito menores que os outros grupos avaliados, apenas o grupo Toxóide Comercial, apresentou igualdade, quando comparado com o Controle Positivo. Os grupos Toxóide e Bacterina + Toxóide igualaram o escore do encontrado no Controle Negativo, até o final das avaliações.

#### 4.2.2.7. Presença de gás no músculo

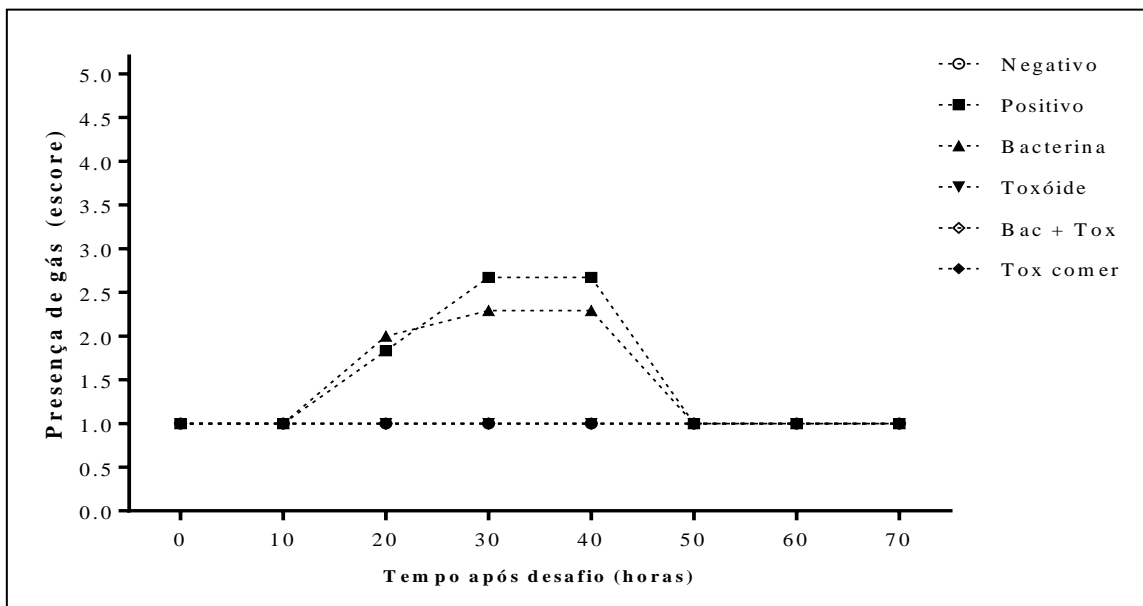
Na Tabela 14 e Gráfico 8 são descritas os diferentes graus de presença de gás no músculo nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

Tabela 14: Escore Presença de gás no músculo dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,83 <sup>AB</sup>	2,67 <sup>B</sup>	2,67 <sup>B</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Bacterina	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	2,29 <sup>B</sup>	2,29 <sup>B</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Bacterina+Toxóide	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>
Toxóide Comercial	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 8: Comportamento do Escore Presença de gás no músculo dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



A presença de gás foi evidente nos grupos Controle Positivo e Bacterina, 20 horas após o desafio, caracterizado por crepitações, quando palpado o membro inoculado, manteve-se até 40 horas após o desafio, não sendo evidenciado nas avaliações consequentes.

#### 4.2.2.8. Cor da Lesão

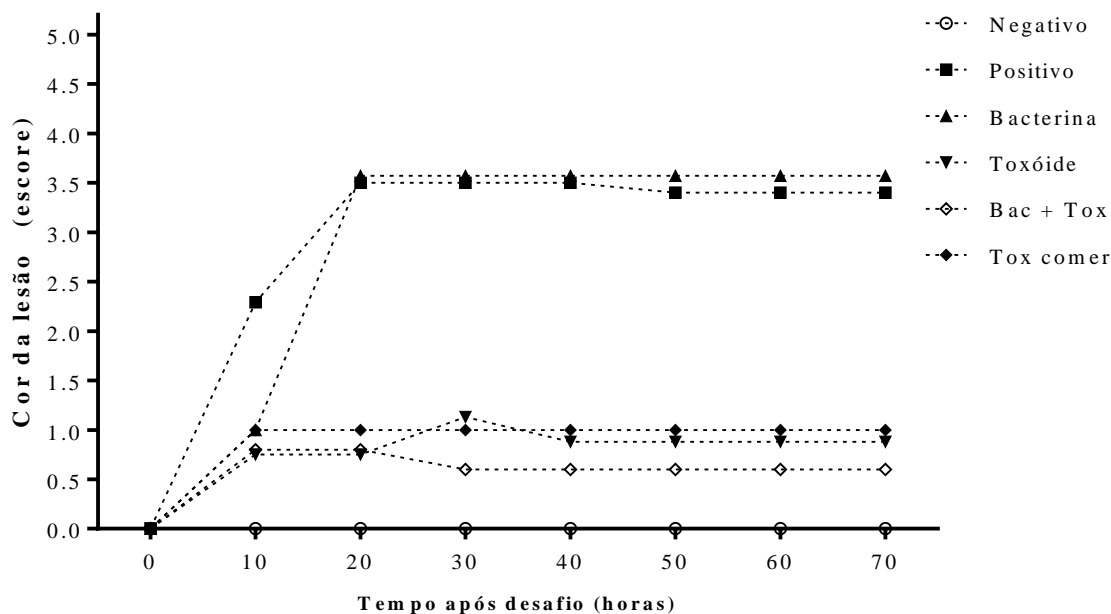
Na Tabela 15 e Gráfico 9 são descritas diferentes graus da cor da lesão encontrados nos seis grupos de animais imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, durante os oito tempos de avaliações.

Tabela 15: Escore Cor da Lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Controle Negativo	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	0,00 <sup>A</sup>	2,29 <sup>B</sup>	3,50 <sup>CD</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,50 <sup>C</sup>	3,40 <sup>CD</sup>	3,40 <sup>CD</sup>	3,40 <sup>CD</sup>
Bacterina	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>	3,57 <sup>D</sup>	3,57 <sup>C</sup>	3,57 <sup>C</sup>	3,57 <sup>D</sup>	3,57 <sup>D</sup>	3,57 <sup>D</sup>
Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	0,75 <sup>B</sup>	0,75 <sup>AB</sup>	1,13 <sup>B</sup>	0,88 <sup>AB</sup>	0,88 <sup>AB</sup>	0,88 <sup>AB</sup>	0,88 <sup>AB</sup>
Bacterina+ Toxóide	0,00 <sup>A</sup>	0,80 <sup>B</sup>	0,80 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>AB</sup>
Toxóide Comercial	0,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>BC</sup>	1,00 <sup>BC</sup>	1,00 <sup>BC</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 9: Comportamento do Escore cor da lesão dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.



Observou-se uma coloração vermelha, no local da inoculação, a partir de quatro até 10 horas após inoculação, em todos os grupos, exceto o Controle Negativo, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados ao grupo Controle Positivo. Na hora vinte aumentaram os escores, dos grupos Controle Positivo e Bacterina, caracterizado por uma coloração da derme esverdeada. A partir da hora 30 essa coloração tornou-se mais evidente, tanto nas regiões que apresentaram edema, como também, na pele com bolhas que apareceram neste momento da avaliação, sendo que a mesma apresentou-se um pouco mais escura. Este comportamento foi evidenciado até o final das avaliações. Da hora 50 até a hora 70, o escore do grupo Toxóide Comercial, igualou ao escore do

grupo Controle Positivo. Apesar de evidenciar-se 30 horas após o desafio alterações da coloração da pele no grupo Bacterina + Toxóide, variando desde pequenas áreas vermelhas até esverdeadas em alguns animais, não encontrou-se diferenças estatisticamente significativas ao comparar-se com o grupo Controle Negativo, comportando-se desta forma ao longo das avaliações.

#### 4.2.2.9. Mensuração dos membros pélvicos

As médias das mensurações, em centímetro (cm), dos membros pélvicos, inoculados e não inoculados, dos seis grupos avaliados são representados na Tabela 16.

Tabela 16: Mensurações do diâmetro dos membros pélvicos inoculados e não inoculados de cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, com diferentes protocolos de imunização, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Membro	
	Não Inoculado	Inoculado
Controle Negativo	2,16 <sup>Aa</sup>	2,16 <sup>Aa</sup>
Controle Positivo	2,20 <sup>Aa</sup>	2,89 <sup>Cb</sup>
Bacterina	2,24 <sup>Aa</sup>	2,89 <sup>Cb</sup>
Toxóide	2,15 <sup>Aa</sup>	2,55 <sup>Bb</sup>
Bacterina+Toxóide	2,04 <sup>Aa</sup>	2,43 <sup>ABb</sup>
Toxóide Comercial	2,16 <sup>Aa</sup>	2,56 <sup>Bb</sup>
TOTAL	2,17 <sup>a</sup>	2,58 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pela análise de variância e pelo teste Tukey, com  $P < 0,05$ .

Não foram encontradas diferenças estatísticas ao compararem-se as mensurações dos membros não inoculados na totalidade dos grupos avaliados. Ao comparar o membro não inoculado com o membro inoculado, encontraram-se diferenças estatísticas significativas  $P < 0,05$ , exceto para o grupo Controle Negativo. O resultado era esperado, devido ao fato de que todos os animais tiveram pelo menos um grau leve ou discreto de alteração clínica. Ao compararem-se mensurações dos membros pélvicos inoculados entre os grupos, evidenciou-se que o único grupo que apresentou igualdade com o grupo Controle Negativo, foi apenas o grupo Bacterina + Toxóide. O grupo Bacterina

igualou-se ao grupo Controle Positivo. Os grupos Toxóide e Toxóide Comercial foram iguais, mas diferentes dos grupos Controle Negativo e Controle Positivo. Estes resultados demonstram que o grupo Bacterina + Toxóide, apresentou uma menor resposta inflamatória, com menor aumento de volume do membro inoculado, seguido dos grupos Toxóide e Toxóide comercial.

#### 4.2.3. Escore Clínico Total

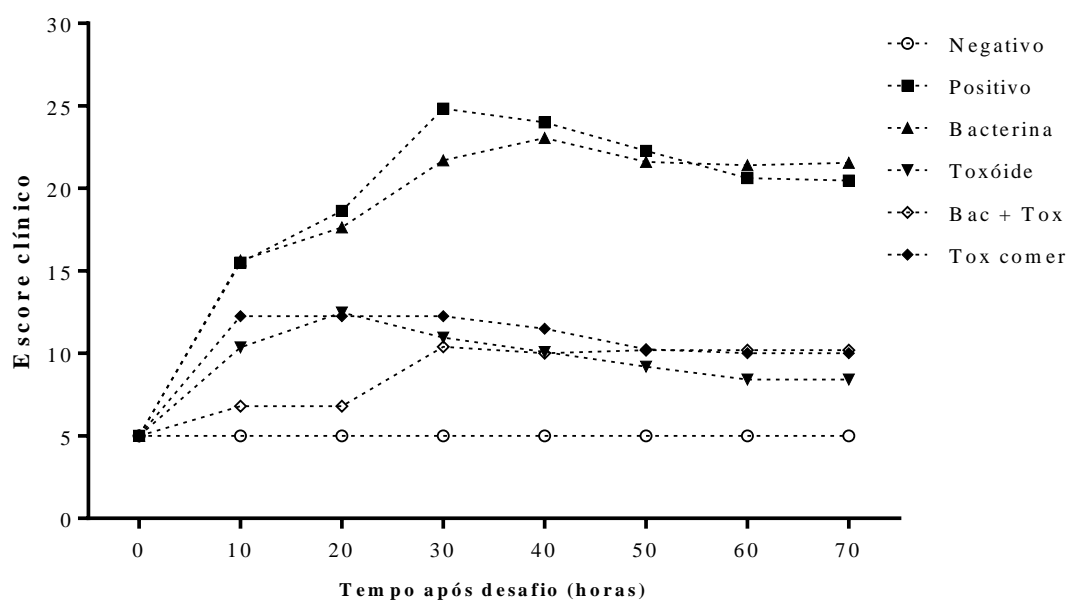
Para a avaliação clínica dos efeitos dos protocolos de imunização, foi realizada a análise do escore clínico total, resultado do somatório dos escores de cada lesão, a cada momento, apresentado anteriormente. Os escores clínicos dos animais dos grupos controle positivo e negativo e dos cinco grupos de cobaios imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular são apresentados na Tabela 17 e Gráfico 10.

Tabela 17: Escores Clínicos Totais dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, nas 70 horas de avaliações, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Hora							
	0	10	20	30	40	50	60	70
<b>Negativo</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Aa</sup>
<b>Positivo</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	17,71 <sup>Dab</sup>	22,33 <sup>Cbc</sup>	28,17 <sup>Dc</sup>	21,17 <sup>Cc</sup>	25,20 <sup>Cbc</sup>	23,80 <sup>CDbc</sup>	23,60 <sup>CDbc</sup>
<b>Bacterina</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	17,00 <sup>CDab</sup>	21,29 <sup>Cbc</sup>	25,14 <sup>CDcd</sup>	28,71 <sup>Cd</sup>	25,14 <sup>Ccd</sup>	25,00 <sup>Dcd</sup>	25,14 <sup>Dcd</sup>
<b>Toxóide</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	11,00 <sup>ABb</sup>	13,13 <sup>Cb</sup>	11,88 <sup>Bb</sup>	10,75 <sup>Bb</sup>	9,88 <sup>Bb</sup>	9,13 <sup>ABab</sup>	9,13 <sup>ABab</sup>
<b>Bact + Tox</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	10,80 <sup>ABb</sup>	10,60 <sup>Bb</sup>	9,46 <sup>ABb</sup>	8,00 <sup>ABb</sup>	8,00 <sup>ABb</sup>	8,00 <sup>ABb</sup>	8,00 <sup>ABb</sup>
<b>Tox Comer</b>	5,00 <sup>Aa</sup>	13,25 <sup>BCb</sup>	13,25 <sup>Bb</sup>	13,25 <sup>BCb</sup>	12,50 <sup>BCb</sup>	11,38 <sup>BCb</sup>	11,00 <sup>BCb</sup>	11,00 <sup>BCb</sup>

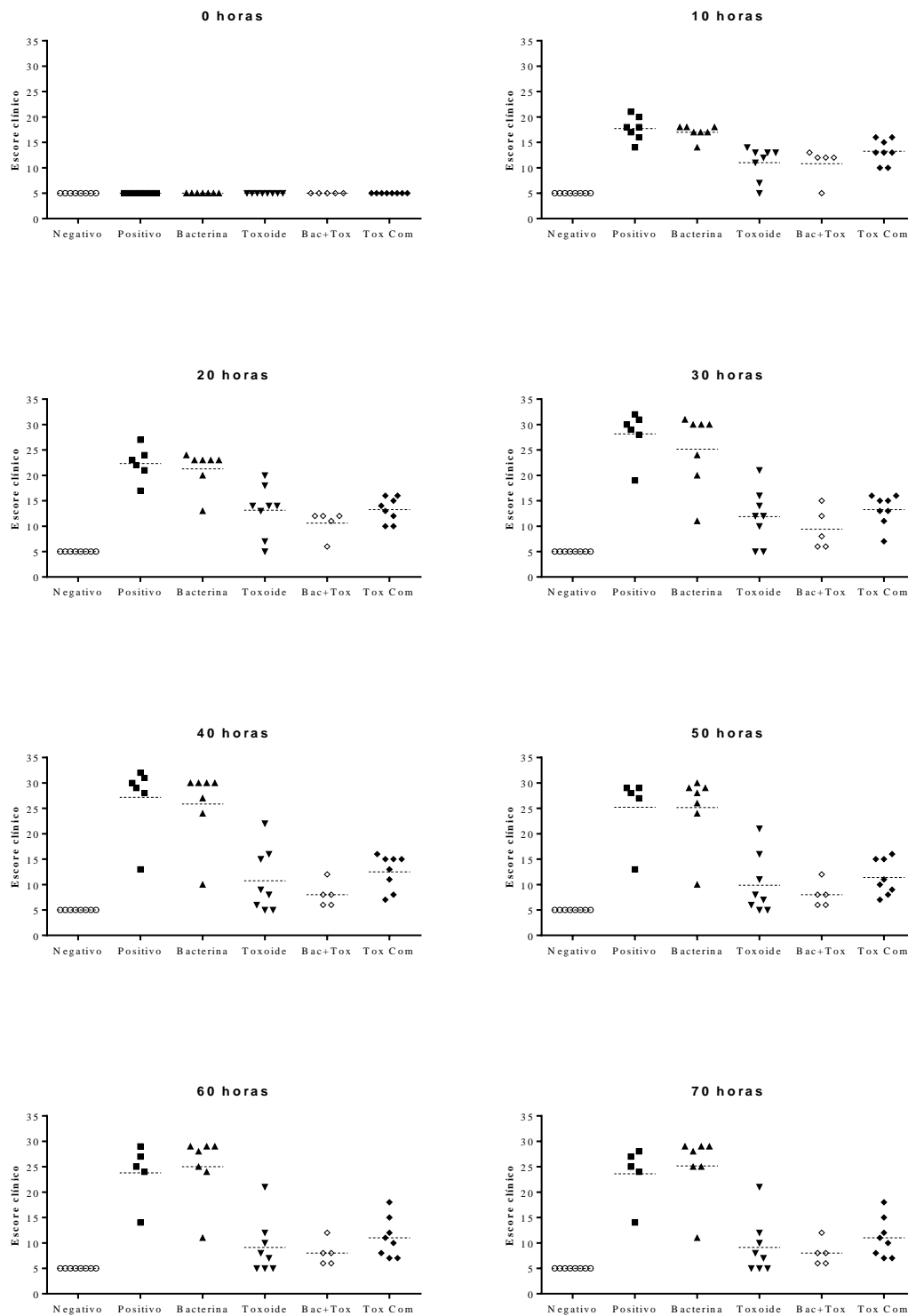
Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste de Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

Gráfico 10: Comportamento dos Escores Clínicos Totais de cobaios imunizados e desafiados por *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular, em 70 horas de avaliação.



A dispersão dos animais por grupo de escore clínico é apresentada no gráfico 11.

Gráfico 11 Gráfico 11. Dispersão por grupo dos escores clínicos totais dos cobaios imunizados e desafiados por *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular em 70 horas de avaliação.





A análise dos gráficos acima permite verificar que os grupos Controle Positivo, e Bacterina, em todos os momentos, apresentaram sinais clínicos mais intensos com pequenas diferenças entre cada indivíduo do grupo. Nos tempos entre 30 e 70 horas existiu um indivíduo que apresentou sinais mais brandos. Por outro lado, nos grupos Toxóide, Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial, os sinais clínicos foram mais brandos na maioria dos indivíduos de cada grupo, porém nos dois primeiros, observou-se em todos os momentos um indivíduo com sinais clínicos mais intensos. Analisando o grupo Toxóide Comercial, verifica-se que vários indivíduos apresentaram escores clínicos acima da média, porém com pequena variação em relação a esta. Estes resultados sugerem que existem alguns animais com diferentes padrões de susceptibilidade ao inóculo utilizado ou que pode ocorrer variação na resposta imunológica entre indivíduos submetidos ao mesmo protocolo de imunização.

As observações clínicas foram realizadas em intervalos de 10 horas, obtendo-se oito tempos para cada grupo. No grupo controle Negativo, o escore clínico manteve-se uniforme e igual ao longo do tempo, o que era esperado, pois inoculou-se apenas solução de soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%) pela via intramuscular. No grupo Controle Positivo, todos os animais apresentaram aumento, estatisticamente significativo, do escore clínico 10 horas e depois 20 horas após o desafio, alcançando o escore máximo 30 horas após o desafio. Na hora 40 houve diminuição do escore, seguido por estabilização até o final das observações.

Os cobaios do grupo Bacterina apresentaram aumento do escore, estatisticamente significativo, 20 horas após a inoculação, seguido por aumento na hora 30 e obtendo-se escore máximo na hora 40. O escore clínico reduziu na hora 50 e

estabilizou-se até o final do experimento. Os animais dos grupos Toxóide, Bacterina + Toxóide e Toxóide comercial apresentaram comportamento similar nos tempos estudados, observando-se diferença estatística apenas 10 horas após inoculação, enquanto que nas horas posteriores o escore se manteve o mesmo até o final das avaliações.

Ao comparar os seis grupos nos diferentes tempos, observa-se que, no tempo zero, não houve diferenças nos escores clínicos. Na hora 10, os grupos Toxóide e Bacterina + Toxóide não apresentaram diferenças estatísticas com o grupo Controle Negativo, enquanto os grupos Bacterina e Toxóide Comercial, quando comparados com os grupos Controle Positivo e Negativo, apresentaram diferenças significativas. Na hora 20, os escores clínicos dos grupos Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial foram diferentes dos grupos Controle Positivo e Negativo, porém, os grupos Bacterina e Toxóide apresentaram diferenças estatísticas apenas com o grupo Controle Negativo.

Nas horas 30, 40 e 50, os escores clínicos de todos os grupos foram diferentes do grupo Controle Negativo, com exceção do grupo Bacterina + Toxóide. Além disso, nestas mesmas horas, observaram-se diferenças em todos os grupos com relação ao grupo Controle Positivo, exceto o grupo Bacterina. Nas horas 60 e 70, somente os grupos Toxóide e Bacterina + Toxóide tiveram escores clínicos iguais ao do grupo Controle Negativo. Ainda nas horas 60 e 70, apenas os grupos Bacterina e Toxóide Comercial não foram diferentes do grupo Controle Positivo.

Com os resultados apresentados anteriormente, percebe-se que o grupo que apresentou melhor comportamento de escore clínico foi o Bacterina + Toxóide, pois não ocorreram diferenças estatisticamente significativas comparando-se com o grupo Controle Negativo durante

as 70 horas de observação e avaliação clínica. Observou-se, também, que o grupo Bacterina apresentou piores resultados no exame clínico por não apresentar, nas 70 horas de avaliação, diferenças significativas quando comparado ao grupo controle positivo. Também pode-se inferir que o grupo Toxóide foi o melhor, depois do grupo Bacterina + Toxóide, pois teve resultados iguais aos do grupo controle negativo em quatro dos oito tempos avaliados. O grupo Toxóide comercial foi igual ao grupo Controle negativo em dois tempos, enquanto o grupo Bacterina foi igual apenas em um tempo do estudo (hora zero).

Os trabalhos científicos avaliando a eficácia de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A na mionecrose, na maioria das vezes, somente avalia as taxas de mortalidade e sobrevivência dos animais inoculados. Trabalhos que avaliam o comportamento clínico são provenientes de modelos experimentais de indução da doença e avaliam clinicamente os animais por até 30 horas após o desafio. Tendo em vista a escassez de trabalhos científicos, há limitação da discussão dos resultados obtidos em intervalos de tempo maiores, como no presente trabalho.

Pires, (2011) relatou comportamento similar dos sinais clínicos aos encontrados neste estudo. Neste trabalho, os cobaios foram inoculados com 0,5 mililitros de uma suspensão contendo aproximadamente  $2,3 \times 10^9$  UFC/ml de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A e 0,5 mililitros de suspensão estéril de  $\text{CaCl}_2$  a 10 % pela via intramuscular. Duas horas após iniciou-se o aparecimento de alterações como: aumento de volume do membro inoculado e certo desconforto, posteriormente apresentando sensibilidade dolorosa no local de inoculação e dificuldade para locomover-se. Vinte e quatro horas após a inoculação, ocorreu a morte de um animal e o restante foi eutanasiado e necropsiado. Os resultados

foram similares quanto ao comportamento clínico e tempo quando ocorreu a primeira morte do grupo Controle Positivo no presente estudo.

Resultados similares foram relatados por Awad et al. (2001), que observaram desconforto, edema, claudicação a partir de duas horas após a inoculação do agente na maioria dos grupos estudados, assim como também, mudanças no aspecto da lesão, passando de uma lesão edematosa até aspecto enegrecido “blackening” que se estendeu desde a coxa inoculada até os dígitos, sugerindo a ocorrência de falta de perfusão tecidual.

Altemeier et al. (1947) relataram resultados que diferem deste experimento, já que encontraram 100% de mortalidade de 274 cobaios em período inferior a quatro dias, após o desafio com células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A. Este resultado apresenta discrepâncias, possivelmente devido à metodologia utilizada no desafio, pois este foi realizado com concentrações de  $10^6$  até  $10^9$ .

A dose de desafio utilizada ( $10^7$ ) mostrou-se adequada, pois promoveu a manifestação clínica da doença, sem levar os animais à morte. Stevens et al. (2004) realizaram um estudo com camundongos, inoculando concentrações desde 107, 108 e 109 UFC/ml, obtendo 60 %, 100% e 100% de mortalidade antes das 18 horas de avaliação. Estes resultados diferem da mortalidade encontrada neste trabalho, realizada as mesmas concentrações de inoculação. Em contrapartida o início do aparecimento dos sinais clínicos foram similares, observando aumento de volume do membro inoculado duas horas após o desafio, nas diferentes concentrações. A coloração da lesão foi diferente, evidenciando coloração escura do membro inoculado em 30 % dos animais de quatro a cinco horas após o desafio. Possivelmente, estas diferenças encontradas tanto na mortalidade como nos sinais clínicos,

estejam relacionadas com a susceptibilidade das diferentes espécies utilizadas, podendo ser o camundongo mais susceptível à mionecrose por *Clostridium perfringens* tipo A.

O'Brien et al. (2008), relataram a importância dos neutrófilos para proteção contra a morte por infecções pelo *Clostridium perfringens* tipo A. A inoculação de camundongos pela via intramuscular com diferentes concentrações da bactéria, evidenciou que animais que apresentavam depleção experimental de neutrófilos tiveram menor mortalidade do que animais com valores de neutrófilos normais. Além disso, estes autores descreveram que os animais quando foram desafiados com diluições de  $10^7$  UFC/mL apresentaram um percentual de mortalidade baixo e animais com  $10^6$  UFC/mL tiveram 0 % de mortalidade tanto no grupo tratado como no grupo controle. Esses dados concordam com este experimento, sendo a mortalidade igual nos grupos avaliados.

#### **4.3. AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS**

As necropsias foram realizadas imediatamente após a eutanásia dos cobaios e as lesões foram avaliadas pelo mesmo observador e os achados anotados em fichas específicas, na forma de escore.

Os escores de aumento de volume do membro inoculado (AVMI), cor do membro inoculado (CMI), bolhas e ulcerações (BEU), percentual de lesão do membro inoculado (PMI), hemorragia (HEM), edema (EDEM), necrose (NEC), necrose de liquefação (NECL), percentual de necrose de liquefação (PNECL) e hemorragia no membro contralateral (HEMC) são representados a Tabela 18.

Tabela 18: Escores dos parâmetros macroscópicos avaliados nos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

GRUPO	AVMI	CMI	BEU	PMI	HEM	EDEM	NEC	NECL	HEMC	PNECL	TOTAL
Negativo	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	10,00 <sup>A</sup>
Positivo	3,29 <sup>C</sup>	3,57 <sup>C</sup>	2,86 <sup>B</sup>	2,86 <sup>B</sup>	3,00 <sup>B</sup>	3,43 <sup>C</sup>	2,86 <sup>CD</sup>	2,86 <sup>B</sup>	1,71 <sup>AB</sup>	3,14 <sup>C</sup>	29,57 <sup>C</sup>
Bacterina	3,43 <sup>C</sup>	4,00 <sup>C</sup>	2,86 <sup>B</sup>	3,14 <sup>B</sup>	2,57 <sup>B</sup>	2,86 <sup>BC</sup>	3,14 <sup>D</sup>	1,71 <sup>AB</sup>	1,29 <sup>AB</sup>	2,14 <sup>BC</sup>	27,14 <sup>C</sup>
Toxóide	1,88 <sup>B</sup>	2,88 <sup>BC</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,13 <sup>A</sup>	2,25 <sup>B</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	2,13 <sup>BCD</sup>	1,25 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,25 <sup>A</sup>	16,25 <sup>B</sup>
Bact.+Tox.	1,80 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,00 <sup>A</sup>	2,00 <sup>B</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,20 <sup>AB</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,40 <sup>AB</sup>	12,8 <sup>AB</sup>
Tox. Com.	1,25 <sup>AB</sup>	1,38 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	2,13 <sup>B</sup>	1,50 <sup>AB</sup>	1,75 <sup>ABC</sup>	1,38 <sup>A</sup>	1,75 <sup>B</sup>	1,75 <sup>AB</sup>	15,38 <sup>B</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, apresentam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

A inoculação de soro fisiológico não causou alterações necroscópicas no grupo Controle Negativo. Por outro lado, o grupo Controle Positivo desenvolveu quadro intenso de necrose muscular, refletindo no elevado escore de todos os parâmetros necroscópicos analisados.

O grupo Bacterina apresentou lesões semelhantes ao Controle Positivo e, os escores de alterações de todos parâmetros necroscópicos analisados foram semelhantes ( $p>0,05$ ) aos daquele grupo. Desta forma, as lesões foram graves e extensas, culminando com a ocorrência de necrose em todos os animais.

Nos grupos Toxóide e Toxóide Comercial, as lesões foram menos intensas e mais localizadas, refletindo em alguns escores que se assemelharam estatisticamente ( $p>0,05$ ) aos do grupo Controle Negativo, como por exemplo, em relação à presença de bolhas e ulcerações (BEU), percentual de lesão do membro inoculado e necrose de liquefação. No grupo Toxóide comercial a hemorragia no membro contralateral foi mais intensa do que no Controle Negativo e Toxóide.

O grupo Bacterina + Toxóide apresentou resultado semelhante ( $p<0,05$ ) ao do Controle Negativo. Na análise de alguns parâmetros, verifica-se que ocorreram pequenas alterações nos animais deste grupo, como por exemplo, presença de pequenas áreas de hemorragia (HEM) e de necrose de liquefação (NECL x PNECL), que contribuíram para a discreta elevação do escore necroscópico total.

Os parâmetros AVMI e CMI, nos grupos Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial apresentaram escore de aumento de volume do membro inoculado iguais aos animais do grupo Controle Negativo, sendo que os grupos Toxóide e Bacterina apresentaram escores superiores se comparados com o

Controle Negativo e inferior ao controle positivo com exceção do grupo Bacterina que foi igual ao Controle Positivo.

Bolhas e ulcerações na epiderme e o percentual afetado do membro inoculado foram mais intensos nos animais dos grupos Controle Positivo e Bacterina, não encontrando-se diferenças nos outros grupos avaliados. A hemorragia no local de inoculação foi igual nos grupos desafiados, sendo todos diferentes ao grupo Controle Negativo.

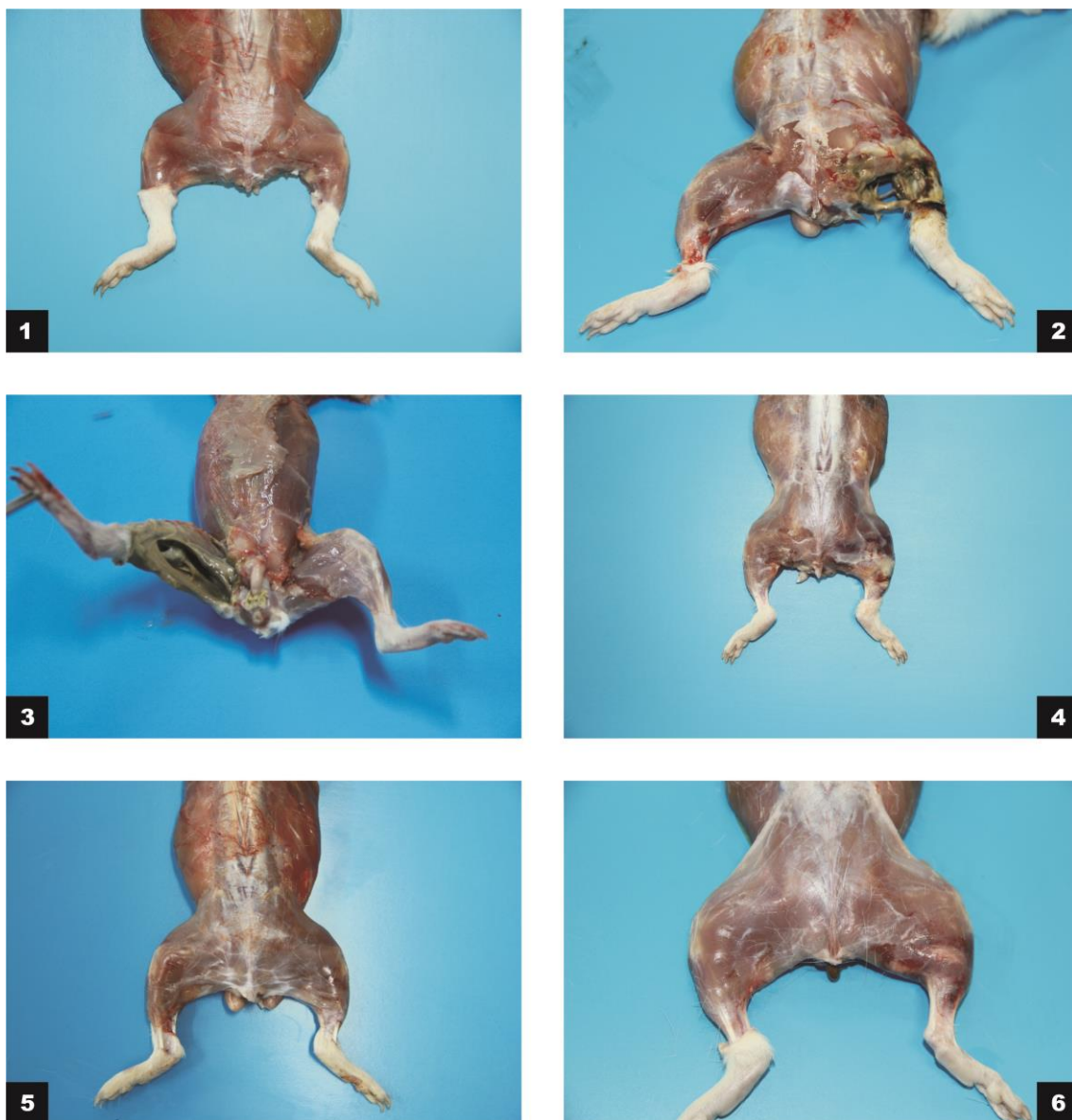
O edema foi igual quando se comparou os grupos Toxóide, Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial com o Controle Negativo. Já no grupo Bacterina observou-se aumento do escore que comportou-se inferior ao escore do grupo Controle Positivo. Todos os grupos avaliados apresentaram diferenças quando comparados com o Controle Negativo, não evidenciaram-se diferenças com o Controle Positivo.

A intensidade da necrose nos grupos Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial não apresentou diferenças ao se comparar com o grupo Controle Negativo, sendo que os grupos Bacterina e Toxóide foram diferentes ao mesmo e iguais ao Controle Negativo.

A presença de necrose de liquefação nos grupos Toxóide e Toxóide Comercial foi igual ao Controle Negativo, sendo que a Bacterina e Bacterina + Toxóide foram iguais ao Controle Positivo. Já no percentual de necrose de liquefação, os grupos Toxóide, Bacterina + Toxóide e Toxóide Comercial foram iguais quando comparados com o Controle Negativo, e o grupo Bacterina igual ao Controle Positivo. Hemorragia no membro contralateral teve diferenças apenas para o grupo Toxóide Comercial ao comparar-se com o Controle negativo.



**Figura 3: Alterações macroscópicas encontradas nos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), pela via intramuscular. (1) e (3) Grupo Controle Negativo: sem alterações, (2) Grupo Controle Positivo e (3) Grupo Bacterina: múltiplas crostas maiores de 2 cm, distribuídas desde a pele da coxa inoculada até o abdômen, e coloração esverdeada. (4) Grupo Toxóide: crostra menor que 2 cm, restrita apenas à pele do local inoculado. (5) Grupo Bacterina + Toxóide e (6) Grupo Toxóide Comercial: sem alterações evidentes.**



**Figura 4:** Alterações macroscópicas encontradas nos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), pela via intramuscular. (1) Grupo Controle Negativo: sem alterações, (2) Grupo Controle Positivo: região da coxa inoculada de aspecto liquefeito difusa, de cor amarronzada, com bordas pretas. (3) Grupo Bacterina: região da coxa inoculada de aspecto liquefeito difusa, de cor amarronzada, e presença de líquido no local da inoculação e musculatura do abdômen. (4) Grupo Toxóide e (6) Grupo Toxóide Comercial: lesão brancacenta, irregular, focalizada ao local de inoculação, rodeada de sufusões distribuídas difusamente na musculatura da coxa inoculada. (5) Grupo Bacterina + Toxóide: presença de hemorragias petequiais e equimóticas, restritas ao local de inoculação.

#### 4.4. Escore Macroscópico Total

Para a avaliação necroscópica dos efeitos dos protocolos de imunização, foi realizada a análise do escore Necroscópico Total, resultado do somatório dos escores de cada lesão, apresentados anteriormente. Os

escores necroscópicos dos animais dos grupos Controle Positivo e Negativo e dos cinco grupos de cobaias imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL pela via intramuscular são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Escores necroscópicos totais dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Escore Necroscópico
Controle Negativo	10,00 <sup>A</sup>
Controle Positivo	29,57 <sup>C</sup>
Bacterina	27,14 <sup>C</sup>
Toxóide	16,25 <sup>B</sup>
Controle Negativo Bacterina+Toxóide	12,80 <sup>AB</sup>
Toxóide Comercial	15,38 <sup>B</sup>

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas, apresentam diferença estatística pelo teste de Kruskal Wallis, com  $P < 0,05$

No grupo Controle Positivo, verificou-se a presença de lesões graves e extensas, com características esperadas pela ação de toxinas histotóxicas produzidas pelo *C. perfringens* tipo A.

Os resultados apresentados na tabela mostram claramente que o único grupo que não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com o grupo Controle Negativo foi o Bacterina + Toxóide. Desta forma pode-se inferir que esta estratégia de imunização foi capaz de controlar a multiplicação do *C. perfringens* tipo A do desafio, a produção de toxinas, e ainda conseguiu neutralizar as toxinas formadas.

Os grupos Toxóide e Toxóide Comercial foram diferentes ( $p < 0,05$ ) tanto para o grupo como também, para o grupo Controle Positivo, ou seja, esta estratégia de imunização foi capaz de proteger os tecidos da ação da toxina alfa, o que refletiu na menor gravidade das lesões quando

comparado com os animais não imunizados desafiados (Controle Positivo).

Os resultados do grupo Bacterina foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) ao Controle Positivo, ressaltando a ineficiência desta vacina em controlar a multiplicação do *C. perfringens* tipo A do desafio e a ação das toxinas produzidas. Neste trabalho, a dose do desafio foi elaborada procurando um modelo que não levasse os animais a óbito, permitindo a avaliação dos sinais clínicos. Apesar disso, esse desafio pode ser muito maior do que aqueles aos quais os animais são submetidos naturalmente. Portanto, numa situação de desafio natural, o comportamento desse protocolo de imunização poderia ser diferente.

O grupo Controle Negativo não demonstrou lesões no local da inoculação do soro fisiológico. Alguns trabalhos com reprodução dos casos de mionecrose utilizam cloreto de cálcio associado ao inóculo bacteriano para causar uma lesão tecidual inicial. Desta forma, Pires (2011),



descreveu lesões no grupo controle negativo que recebeu cloreto de cálcio, incluindo hemorragia, discreto edema subcutâneo, petéquias, equimoses e sufusões. O protocolo de indução de mionecrose utilizado no presente trabalho, sem a utilização de cloreto de cálcio, permitiu uma avaliação mais precisa da ação do agente estudado, sem interferência de substâncias químicas irritantes.

Resultados de necropsia similares aos deste trabalho são relatados por Pires (2011) nos grupos desafiados com  $10^9$  UFC/ml de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A. Foi observado aumento de volume do membro inoculado, crepitação, coloração azul esverdeada de pele e subcutâneo (pseudomelanose “in vivo”), bolhas e ulcerações na derme e epiderme, odor pútrido e líquido hemorrágico, viscoso e untuoso, extensão do edema do subcutâneo desde o local de inoculação até a região tóraco-abdominal ventral e necrose de liquefação em grande parte da coxa inoculada. A produção de gás relatada pelo autor foi maior quando comparada com este experimento, inferindo que pode ter sido devido ao uso de cloreto de cálcio, o que ocasionou uma leve necrose e permitiu um rápido estabelecimento da bactéria e quadros mais graves, assim como também, a quantidade de bactérias inoculadas foi maior.

A toxina alfa do *Clostridium perfringens* tipo A, tem sido relacionada como principal toxina responsável por ocasionar gangrena gasosa em animais infectados experimentalmente (Hatheway, 1999). Várias proposições tem sido discutidas sobre a ação da toxina alfa na patogenia da gangrena gasosa. Uma delas é a capacidade da toxina de hidrolisar fosfolípidios das membranas celulares das células do hospedeiro, com rompimento celular massivo, com posterior liberação de mediadores inflamatórios como: ácido araquidônico, tromboxano A<sub>2</sub>, interleucina 8, fator de necrose tumoral alfa e beta,

ocasionando danos severos às células musculares (Sakurai et al., 2004). Também é proposto que a toxina alfa, após ocasionar lise das células musculares, liberam moléculas sinalizadoras que interagem na regulação de receptores de fibrinogênio nas plaquetas, resultando em agregados de plaquetas e neutrófilos na microvasculatura resultando em formação de trombos com posterior diminuição do fluxo sanguíneo apresentando gangrena por isquemia (Kenedy et al., 2009). Bryant et al. (2000) comprovaram a participação dos neutrófilos na patogenia da gangrena gasosa, avaliando por meio de vídeo-microscopia, após inoculação de toxina alfa em camundongos, a formação de trombos com posterior lesão muscular. Este efeito não foi evidenciado quando foi administrado um soro que destruíra todos os neutrófilos presentes na circulação sanguínea, devido à não formação de agregados de plaquetas e neutrófilos.

Guilhardi et al. (2008) relataram diferenças nas lesões encontradas neste experimento em um touro da raça Simental, de cinco anos de idade, no qual foi diagnosticada gangrena gasosa pelo *C. Perfringens* tipo A. Neste trabalho, os autores observaram lesões musculares condizentes com mionecrose, assim como também, congestão do intestino delgado com conteúdo hemorrágico, fígado com alterações da cor e presença de bolhas de gás. Estas alterações diferem das encontradas, visto que não foram evidenciadas alterações em outros órgãos além do músculo e subcutâneo. Bolhas de gás em diferentes órgãos como fígado podem ser consequência de multiplicação bacteriana após a morte, levando a alterações de autólise, não especificando quantas horas foi realizada a necropsia após a morte do animal.

O isolamento de *Clostridium perfringens* tipo A no diagnóstico da mionecrose deve ser analisado com cuidado, já que faz parte da flora normal do intestino, encontra-se

livremente no ambiente, podendo contaminar as carcaças multiplicando-se de maneira rápida, horas após o óbito. Assim como também não foi descrito a coloração característica esverdeada (pseudomelanose “in vivo”), encontrada nas musculaturas e subcutâneo dos animais do grupo Controle Positivo, infectados neste experimento e por outros autores (Pires et al. , 2011). Assim como também não foi descrita a histopatologia das lesões, com todo o antes dito, gera certa dúvida da participação do *Clostridium perfringens* tipo A como agente causador de morte no animal.

#### 4.5. CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CLÍNICO TOTAL E ESCORE MACROSCÓPICO TOTAL

Para a avaliação da correlação entre os escores, foi realizada uma análise de correlação entre o Escore Clínico Total às 70 horas após o desafio e o Escore Necroscópico Total. Os escores clínicos e necroscópicos dos animais dos grupos Controle Positivo e Negativo e dos cinco grupos de cobaios imunizados e desafiados com  $10^7$  UFC/ mL pela via intramuscular, assim como também sua correlação (r), são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Tabela 20. Correlação entre os Escores Clínicos e Necroscópicos dos cobaios (*Cavia porcellus*) dos seis grupos, desafiados com  $10^7$  UFC/ mL de *Clostridium perfringens* tipo A, pela via intramuscular.

Grupo	Escore	
	Clínico	Macroscópico
Controle Negativo	5,00	10,00
Controle Positivo	23,60	29,57
Bacterina	25,14	27,14
Toxóide	9,13	16,25
Bacterina + Toxóide	8,00	12,80
Toxóide Comercial	11,00	15,38

$R^2$ : 0,888

A análise de correlação entre os escores clínico e macroscópico demonstrou uma alta correlação ( $r^2=0,88$ ) entre os dois, permitindo concluir que as observações clínicas foram realizadas com rigor e, quando transformadas em variáveis quantitativas (escores), conseguiram diminuir sua subjetividade. A observação das lesões na necropsia, exibem menor interferência da subjetividade do que o exame clínico, porém este resultado mostra que houve uma grande acurácia entre os

dois métodos. Desta forma, a avaliação das vacinas contra mionecroses pode ser realizada também pela evolução clínica, de forma objetiva e quantitativa, permitindo maior rigor na seleção de vacinas do que quando se avalia apenas mortalidade.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo de indução experimental utilizado para a avaliação das vacinas demonstrou ser eficiente na reprodução da gangrena gasosa pelo *Clostridium perfringens* tipo A em cobaias, permitindo estudar o comportamento das alterações clínicas ao longo do experimento, assim como também comparar, nos diferentes grupos avaliados as alterações necroscópicas da doença ao final do mesmo.

A indução experimental da doença em cobaias não imunizados, utilizando diferentes concentrações de células vegetativas de *Clostridium perfringens* tipo A, tem um comportamento dose dependente, com alterações e índices de morbidade e mortalidade variados. O uso de cloreto de cálcio como auxiliar da suspensão bacteriana para o desafio, não representa um fator limitante na reprodução desta doença, visto que com a não aplicação do mesmo, obteve-se resultados satisfatórios, evidenciando-se lesões características da doença.

O quadro clínico foi caracterizado apenas por alterações dos sistemas locomotor e tegumentar, afetando exclusivamente a musculatura do membro inoculado, a pele e tecido subcutâneo de regiões adjacentes à inoculada. O mecanismo de formação das lesões musculares está associado à ação da toxina alfa, levando à formação de edema, hipoperfusão tecidual, lise de células musculares, com posterior mionecrose por isquemia.

Imunização com a associação de bactérias e toxinas inativadas do *Clostridium perfringens* tipo A, proporcionam uma adequada resposta protetora, ante o desafio com o agente. A resposta é menor quando utilizada toxinas inativadas, e não

satisfatória quando utilizadas apenas bactérias inativadas.

A avaliação das vacinas contra mionecrose por *Clostridium perfringens* tipo A, pode ser realizada pela avaliação da evolução clínica, de forma objetiva e quantitativa, permitindo maior rigor na seleção de vacinas do que quando se avalia apenas mortalidade.

## 6. CONCLUSÕES

É possível a indução experimental da mionecrose em cobaias a partir da inoculação de células vegetativas do *Clostridium perfringens* tipo A pela via intramuscular.

Alterações como perda da sensibilidade, claudicação de elevação, presença de gás no músculo, edema, bolhas e crostas na pele, coloração esverdeada “*pseudomelanose in vivo*”, gangrena úmida e seca da pele, necrose de liquefação muscular, caracterizam clínica e macroscopicamente a doença.

Na gangrena gasosa experimental em cobaias por *Clostridium perfringens* tipo A, as alterações clínicas e macroscópicas são de curso agudo e irreversível, com mortalidade variada, dependendo da dose utilizada.

O melhor protocolo de imunização foi a utilização de Bacterina + Toxóide.

É possível avaliar a eficácia de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo A, em cobaias, utilizando-se escores clínicos e macroscópicos.

O modelo de avaliação de vacinas realizado neste estudo pode ser um padrão de avaliação para vacinas contra mionecrose por outros clostrídios histotóxicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUTARBUSH, S. M.; CARMALT, J. L.; WILSON, D. G. et al. Jejunal hemorrhage syndrome in 2 Canadian beef cows. *Canadian Veterinary Journal*, v. 45, p. 45-48, 2004.
- AWAD, M. M.; ELLEMOR, D. M.; BOYD, R. L. et al. Synergistic Effects of Alpha-toxin and Perfringolysin O in *Clostridium perfringens* - Mediated Gas Gangrene. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 12, p. 7904-7910, 2001.
- BACCIARINI, L. N.; PAGAN, O.; FREY, J. et al. *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2-toxin in an African Elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis. In: Scientific Meeting, May 31<sup>th</sup> - June 4<sup>th</sup>, 2000, Paris, 2000. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV). P. 1-4.
- BATES, M. T. Gás Gangrene: a review of thirty-two cases with special reference to the use of serum, both prophylactic and therapeutic. *Annals of Surgery*, p. 257-264, 1936.
- BOYD, N. A.; THOMSON, R. O.; WALKE, P. D. The prevention of experimental *Clostridium novyi* and *Cl. perfringens* gas gangrene high-velocity missile wounds by active immunization. *Med. Microbiol.*, v. 5, p. 467-472, 1972.
- CHOI, Y. K.; KANG, M. S.; YOO, H. S. et al. *Clostridium perfringens* type A myonecrosis in a horse in Korea. *Journal Veterinary Medical Science*, v. 65, n.11, p. 1245-47, 2003.
- DIRKSEN, G. *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1993, 429p.
- FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; TITBALL, R. W. et al. UDP-glucose Deficiency Causes Hypersensitivity to the Cytotoxic Effect of *Clostridium perfringens* Phospholipase C. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 38, p. 24433-24438, 1998.
- FLORES-DÍAZ, M.; THELESTAM, M.; CLARK, G. C. et al. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe*, v. 10, p. 115-123, 2004.
- FLORIN, I. Isolation of a fibroblast mutant resistant to *Clostridium difficile* toxins A and B. *Microb. Pathol.*, v. 11, n. 5, p. 337-346, 1991.
- GARCIA-ALVARADO, J. S.; LABBÉ, R. G.; RODRIGUEZ, M. A. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 4, p. 1411-1414, 1992.
- GODDEN, S. Jejunal Hemorrhage Syndrome in Adult Dairy Cows. In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> Western Dairy Management Conference. 2003, p. 179-184.
- GONÇALVES, L. A.; FREITAS, T. D.; ASSIS, R. A. et al. Primeiro relato no Brasil de mastite necrótica bovina por *Clostridium perfringens* tipo A. *Ciência Rural*, v. 36, n. 4, p. 13331-13332, 2006.
- GUILHARDI, J. C. P.; GREGHI, G.; NUNES, E. A. M. Gangrena Gasosa por *Clostridium perfringens* tipo A em bovino vacinado: relato de caso. *Ensaio e Ciência*, v. 12, n. 1, p. 181-186, 2008.
- GUILLOUARD, I.; GARNIER, T.; COLE, S. T. Use of Site-Directed Mutagenesis to Probe Structure-Function Relationships of Alpha-Toxin from *Clostridium perfringens*. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 7, p. 2440-2444, 1996.
- HARRIS, C. M.; LEVITON, L. R. Penicillin Treatment of Gás Gangrene. *American Journal of Surgery*, v. 69, n. 3, p. 391-396, 1945.
- HATHEWAY, C. L. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3,

n. 3, p. 66-98, 1990.

HEIKINHEIMO, A. *Diagnostics and molecular epidemiology of cpe-positive Clostridium perfringens type A.76f.*, 2008. Academic Dissertation (Department of Food and Environmental) - Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

HICKEY, M. J.; KWAN, R. Y. Q.; AWAD, M. M. *et al.* Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *Plos. Pathogens*, v. 4, n. 4, p.1-9, 2008.

KALENDER, H.; KILIC, A.; ATIL E. Enterotoxemia in a cow due to *Clostridium perfringens* Type A. *Turkey Journal Veterinary*, v. 31, n. 1, p. 83-84, 2007.

KENNEDY, C. L.; LYRAS, D.; CHEUNG, J. K. *et al.* Cross-complementation of *Clostridium perfringens* PLC and *Clostridium septicum*  $\alpha$ -toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene. *Microbes and Infection*, v. 11, p. 413-418, 2009.

KEYBURN, A. L.; BANNAM, T. L.; MOORE, R. J. *et al.* NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins*, v. 2, p. 1913-1927, 2010.

MACFARLANE, M. G.; KNIGHT, B. C. J. G. The Lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *The Biochemistry of Bacterial Toxins*, v. 98, p. 884-902, 1941.

MARTIN, T. G.; SMYTH, J. A. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet. Microbiol.*, v. 136, n. 1-2, p. 202-205, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 49 de 12 mai. 1997. Regulamento Técnico, Departamento de Defesa Animal, 12 mai. 1997, 4p.

LEE, M. H.; SARTORELLI, A. C. Combination chemotherapy with *Clostridium perfringens* phospholipase C and cytosine antimetabolites: complementary inhibition directed at membrane lipids. *Cancer Drug Deliv.*, v. 1, n. 1, p. 21-36, 1983.

LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; SALVARANI, F. M. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v. 102, p. 23-34, 2007.

LOWRY, K. F.; CURTIS, G. M. Diagnosis of Clostridial Myositis. *American Journal of Surgery*, v. 74, n. 3, p. 752-757, 1947.

LUCEY, B. P.; HUTCHINS, G. M. William H. Welch, MD, and the Discovery of *Bacillus welchii*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 128, p. 1193-1195, 2004.

OWEN, H. R.; THOMPSON, W. D. JR. Gas Gangrene. *American Journal of Surgery*, v. 44, n. 1, p. 39-45, 1939.

PIRES, P. S. *Estudo Patológico, padronização e uso da imunohistoquímica em animais experimentalmente e naturalmente infectados com Clostrídios Histotóxicos*. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RAHMAN, H.; CHAKRABORTY, A.; RAHMAN, T. *et al.* Clostridial myonecrosis

clinically resembling black quarter in an Indian elephant (*Elephas maximus*). *Revue Scientifique et Technique*, v. 28, n. 3, p. 1069-75, 2009.

ROEDER, B. L.; CHENGAPPA, M. M.; NAGARAJA, T. B. *et al.* Experimental induction of abdominal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration by intraruminal inoculation of *Clostridium perfringens* type A in neonatal calves. *American Journal Veterinary*, v. 49, n. 2, p. 201-207, 1988.

- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M. *Clostridium perfringens* alpha toxin: characterization and mode of action. *Journal of Biochemistry*, v. 136, n. 5, p. 569-574, 2004.
- SCHOONDERWOERD M.; SHOLTEN, J. A; LEWIS, I. L. Acute gangrenous mastitis due to *Clostridium perfringens* type A and *Escherichia coli* in a cow. *Canadian Veterinary Journal*, v. 31, p.523-524, 1990.
- SNYDER, H. E. Surgery on the Prophylaxis, Diagnosis and Treatment of Gas Gangrene. *American Journal of Surgery*, v. 87, n. 3, p. 479-481, 1954.
- STEVENS, D. L.; TITBALL, R. W.; JEPSON, M. *et al.* Immunization with the C-domain of Alpha-Toxin prevents lethal infection, localizes tissue injury, and promotes host response to challenge with *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.*, v. 190, n. 4, p. 767-773, 2004.
- SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Review. *Clinical Microbiology*, v. 9, p. 216-234, 1996.
- SONGER, J. G.; MISKIMINS, D. W. Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Veterinary Anaerobes and Diseases*, v.11, p. 290-294, 2005.
- TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Anaerobe*, v. 5, n. 2, p. 51-64, 1999.
- TITBALL, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*, v. 27, p. 44-47, 2009.
- TAJIK, J; MOHAMMADI, G. R; RAD, M. *et al.* Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle in Iran: a case report. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 11, n. 2, p. 180-183, 2010.
- URSCHEL, J. D. Necrotizing soft tissue infections. *Postgrad Med J.*, v. 75, p. 645-649, 1999.
- VAN METRE, C. V. *Clostridium perfringens* Type A and the calf. **In: 80th Western Veterinary Conference.** p. 1-5, 2006.
- WANG, G.; ZHANG, P.; PAREDES-SABJA, D. *et al.* Analysis of the germination of individual *Clostridium perfringens* spores and its heterogeneity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, p. 1212-1223, 2011.
- WILLIAMSON, E. D.; TITBALL, R. W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, v. 11, n. 12, p. 1253-1258, 1993.