

## DETECÇÃO DOS GENES DAS TOXINAS ALFA ( $\alpha$ ), BETA ( $\beta$ ) E ÉPSILON ( $\epsilon$ ) EM AMOSTRAS DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLADAS DE BOVINOS PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

**M.D.L. Penha<sup>1</sup>, L. Baldassi<sup>2</sup>, A. Cortez<sup>1</sup>, R.M. Piatti<sup>2</sup>, L.J. Richtzenhain<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

### RESUMO

O *Clostridium perfringens*, microrganismo anaeróbico, está presente no solo e no trato intestinal dos mamíferos. Provoca gangrena gasosa e intoxicação alimentar nos seres humanos e doenças enterotoxêmicas nos animais domésticos. O *C. perfringens* é classificado em 5 tipos (A, B, C, D e E) mediante a produção de quatro toxinas principais (alfa- $\alpha$ , beta- $\beta$ , gama- $\gamma$ , delta- $\delta$  e épsilon- $\epsilon$ ). A identificação destas toxinas é realizada através da reacção de soroneutralização em animais utilizando anti-soros específicos, os quais, além do alto custo, são de difícil obtenção em laboratórios de referência internacionais. Visando contribuir para a tipificação de amostras de *C. perfringens*, em nosso meio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a reacção em cadeia da polimerase (PCR) na detecção dos genes que codificam as toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*) e épsilon (*etx*) em isolamentos provenientes de bovinos. A sensibilidade analítica da técnica de PCR padronizada a partir do DNA total bacteriano foi de 2,27 ng/ $\mu$ L para o gene *cpa* e 227 pg/ $\mu$ L para os genes *cpb* e *etx*. Das 35 amostras de *C. perfringens* isoladas e tipificadas por PCR, 16 (45,7%) foram do tipo A, 18 (51,4%) foram do tipo C e 1 (2,9%) foi do tipo B.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Clostridium perfringens*, tipificação, bovinos, PCR.

### ABSTRACT

DETECTION OF ALFA, BETA AND EPSILON TOXINS GENES IN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS STRAINS ISOLATED FROM BOVINES BY THE POLIMERASE CHAIN REACTION. The *Clostridium perfringens*, an aerobic microorganism, is present in soil and intestinal tracts of mammals. It causes gaseous gangrene and food intoxication in human beings and enterotoxemic diseases in domestic animals. *C. perfringens* is classified into 5 types (A, B, C, D and E) according to the production of four main toxins: (alfa- $\alpha$ , beta- $\beta$ , gama- $\gamma$ , delta- $\delta$  and épsilon- $\epsilon$ ). The identification of these toxins is made through serum neutralization test in animals, using specific anti-sera, however these reagents are of high cost and difficult to be obtained from international reference laboratories. To aid in the typing of the *C. perfringens* strains in our environment, the present work aimed to assess the use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of the genes coding the alpha (*cpa*), beta (*cpb*) and epsilon (*etx*) toxins in bovine isolates. The analytical sensitivity of the PCR technique, standardized from the total bacterial DNA, was 2.27 ng/ $\mu$ L for the *cpa* gene and 227 pg/ $\mu$ L for the *cpb* and *etx* genes. Among the 35 *C. perfringens* isolates typed by PCR, 16 (45.7%) were of type A, 18 (51.4%) of type C, and 1 (2.9%) belonged to type B.

**KEY WORDS:** *Clostridium perfringens*, typing, bovines, PCR.

### INTRODUÇÃO

A espécie *Clostridium perfringens* é um grupo heterogêneo de microrganismos anaeróbios, semelhantes nos aspectos bioquímicos e de cultura, que são diferenciados através da estrutura antigênica de suas toxinas (SMITH, 1979; NILO, 1980; BEER, 1988).

O *C. perfringens* causa gangrena e intoxicação alimentar nos seres humanos e doença enterotoxêmica nos animais domésticos (ROOD, 1998).

As cepas de *C. perfringens* produzem 16 fatores de virulência: as toxinas alfa (a), beta (b), gama (g), delta (d), épsilon (e), eta (h), teta (q), iota (i), kapa (k), lambda (l), mu (m) e nu (n); neuraminidase; sialidase;

<sup>2</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

enterotoxina; hemolisina não alfa-delta-teta. Mediante à produção de quatro toxinas principais, o *C. perfringens* é classificado em cinco tipos: A ( $\alpha$ ); B ( $\alpha, \beta$  e  $\epsilon$ ); C ( $\alpha$  e  $\beta$ ); D ( $\alpha$  e  $\epsilon$ ) e E ( $\alpha$  e i) (SMITH & HOBBS, 1974).

O diagnóstico do *C. perfringens* exige cultivo do microrganismo em meios de cultura, isolamento e identificação da espécie através de provas bioquímicas (UZAL *et al.*, 1996; BALDASSI, 1998). O cultivo de amostras em meios seletivos e a detecção do *C. perfringens* através de suas propriedades específicas é um processo lento e laborioso (VAHJEN *et al.*, 2000).

A tipificação do *C. perfringens* é realizada pelo teste de soroneutralização em camundongos ou cobaias, empregando antitoxinas padrão (anti-á, anti-â, anti-ã e anti-i) fornecidas por laboratórios de referência (STERNE & BATTY, 1975). A prova baseia-se na neutralização da letalidade das diferentes toxinas pelas anti-toxinas padrão, o que é verificado após 3 dias. Todavia, caso haja toxinas em quantidades suficientes, a neutralização da letalidade pode ser verificada em até 10h (WALKER, 1990).

A metodologia convencional para diagnóstico e tipificação do *C. perfringens* é onerosa, utiliza animais de laboratório e fornece resultados não totalmente satisfatórios (BUOGO *et al.*, 1995). Esse procedimento requer antitoxinas específicas contra cada uma das toxinas principais do *C. perfringens*, as quais não estão disponíveis comercialmente (WARREN *et al.*, 1999).

Algumas variantes encontradas dentro dos 5 tipos do *C. perfringens* produzem pequenas quantidades de toxinas ou nem sequer são capazes de produzi-las, o que torna impossível a tipificação através do teste de neutralização em camundongos (UZAL *et al.*, 1996; WARREN *et al.*, 1999).

Os testes com animais não são adequados para estudos epidemiológicos em larga escala e não se prestam para a detecção rotineira de organismos toxigênicos (BALDASSI, 1998).

As técnicas moleculares foram introduzidas para o diagnóstico do *C. perfringens* com a finalidade de evidenciar os genes que codificam as toxinas principais. Elas são simples e rápidas para diagnosticar e tipificar esse microrganismo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma dessas técnicas (BUOGO *et al.*, 1995; UZAL *et al.*, 1996; UZAL *et al.*, 1997; MEER & SONGER, 1997; WARREN *et al.*, 1999; VAHJEN *et al.*, 2000).

A correta identificação das variantes do *C. perfringens* é crítica para estudos epidemiológicos e para o desenvolvimento de medidas preventivas efetivas (PETIT *et al.*, 1999).

A técnica da PCR é específica e sensível, permitindo o processamento de muitas amostras em um curto período de tempo e uma determinação mais completa das variantes do *C. perfringens* (MEER & SONGER, 1997; PETIT *et al.*, 1999; VAHJEN *et al.*, 2000).

Em nosso meio, embora a técnica da PCR apresente as vantagens acima descritas, não foi possível verificar na literatura científica consultada qualquer trabalho que mencionasse a aplicação dessa metodologia para o diagnóstico e tipificação do *C. perfringens*.

Tendo em vista a problemática de tipificação de amostras de *C. perfringens*, decorrente da indisponibilidade de antitoxinas padrão em nosso meio, o presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de PCR para a detecção dos genes que codificam as toxinas á, â e ã do *C. perfringens* e tipificar amostras deste patógeno isoladas de bovinos pelo Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, SAA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras padrão de *C. perfringens*

Foram utilizadas amostras padrão de *C. perfringens* dos Tipos A, B, C e D do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, SAA.

### Amostras de campo de *C. perfringens*

Foram estudadas 35 amostras de campo de *C. perfringens* isoladas pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, SAA, a partir de amostras de fezes e órgãos (fígado, rim, músculo e coração) de bovinos.

### Cultivo das amostras padrão e de campo de *C. perfringens*

A metodologia para o cultivo das amostras padrão e de campo de *C. perfringens* foi baseada naquela descrita por BALDASSI (1998).

### Metodologia de diagnóstico pela técnica da PCR

O protocolo para a técnica da PCR foi baseado naquele descrito por MEER & SONGER (1997).

### Extração do DNA

As bactérias das culturas de *C. perfringens* em caldo de carne cozida foram colhidas por meio de centrifugação (5.000 xg, por 15 min), lavadas uma vez com água de Milli-Q (Millipore) e ressuspendidas em 1,5 mL da solução TE. Desta suspensão bacteriana foram tomados 100 mL e adicionados a igual volume de tampão de lise (AUSUBEL *et al.*, 1999) contendo 20 mL de pK 20 mg/mL, 20 mL SDS a 10% e 40 mL de tampão

(100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 250 mM de NaCl) e mantido a 56° C por 90min. A seguir foi realizada a extração descrita por CHOMKZYNSKY (1993).

#### **Amplificação e visualização de DNA alvo**

Os primers utilizados na técnica da PCR foram os descritos por MEER & SONGER (1997). Para a Toxina- $\alpha$  (gene *cpa*): fragmento amplificado com 324 pb; 5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGACC-3' - posição 1438-1457 e 5'-TCTGATACATCGTGAAG-3' - posição 1762-1743. Para a Toxina- $\beta$  (gene *cpb*): fragmento amplificado com 196 pb; 5'-GCCAATATGCTGAATCATCTA-3' - posição 871-891 e 5'-GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3' - posição 1067-1046. Para a Toxina- $\epsilon$  (gene *etx*): fragmento amplificado com 655 pb; 5'-GCGGTGATATCCATCTATTC-3' - posição 227-246 e 5'-CCACTTACTTGTCTACTAAC-3' - posição 882-862.

Para cada par de primers foi realizada uma PCR num volume final de 50  $\mu$ L contendo Triton a 0,5%, 1X Reaction Buffer, 0,2 mM de cada dNTP's, 25 pmoles de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de Taq DNA polimerase e H<sub>2</sub>O ultrapura q.s.p. As condições de amplificação foram 94° C / 3 min. e 40 ciclos de 94° C / 30 seg., 53° C / 30 seg., 72° C / 30 seg. e uma extensão final de 72° C / 10min. Um volume de 10  $\mu$ L de cada produto obtido foi submetido à eletroforese por 30 min a 100V em um gel de agarose a 1,5% contendo 0,5  $\mu$ g de brometo de etídio/mL.

As bandas amplificadas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultra-violeta. Um padrão de fragmentos de DNA com incrementos de 100 pb foi utilizado como referência.

#### **Avaliação da sensibilidade analítica da técnica da PCR na deteção dos genes *cpa* *cpb* e *etx***

Para determinar a sensibilidade analítica da PCR, foi utilizada a amostra padrão de *C. perfringens* do tipo B, que contem os 3 genes.

Após extração (item 2.4.1.), o DNA bacteriano foi quantificado em espectrofotômetro e adicionado a tubos contendo TE de maneira a obter concentrações de 2.270 ng/ $\mu$ L a 227 pg/ $\mu$ L. Cada uma das diluições foi submetida a técnica de PCR acima descrita de modo a determinar a menor concentração de DNA bacteriano capaz de produzir uma reacção positiva na PCR, para cada um dos genes. Todas as reacções foram realizadas em duplicata.

#### **Pesquisa dos genes *cpa* *cpb* e *etx* em amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos pela técnica de PCR**

As 35 amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos foram submetidas a reacção de PCR para pesquisa dos genes *cpa*, *cpb* e *etx* de acordo com o descrito no item 2.4.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da sensibilidade analítica da reacção de PCR para a deteção dos genes de *C. perfringens* estudados revelou os seguintes valores: gene *cpa* = 2,27 ng/ $\mu$ L; gene *cpb* = 227 pg/ $\mu$ L e gene *etx* = 227 pg/ $\mu$ L (Fig. 1).

A Figura 2 exemplifica os resultados de tipificação obtidos pela técnica de PCR de algumas amostras de *C. perfringens* isoladas.

A Tabela 1 apresenta os resultados da tipificação, pela técnica de PCR, das amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, SAA.

O presente estudo foi realizado com uma amostragem de conveniência, constituída pelas amostras isoladas pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, SAA. Dessa forma, embora inferências quanto a prevalência dos tipos de *C. perfringens* isoladas de bovinos em nosso meio sejam improcedentes pela carência de desenho amostral, a seguir são feitas algumas considerações importantes do ponto de vista epidemiológico.

Das 35 amostras de campo de *C. perfringens* tipificadas por PCR, 16 (45,7%) foram do tipo A, 18 (51,4%) foram do tipo C e 1 (2,9%) foi do tipo B, não havendo deteção de amostras do tipo D. Essa distribuição mostra um forte predomínio das amostras do tipo A e C, o que discorda da literatura internacional que aponta os tipos B e D como os mais freqüentes para bovinos (McDONEL, 1980; HATHEWAY, 1990). Estes autores basearam a tipificação em características fenotípicas (soroneutralização das toxinas), ressaltando a possibilidade de tipificações incorretas decorrentes do nível insuficiente de expressão das diferentes toxinas.

Na literatura compulsada, não pudemos verificar trabalhos que tenham objetivado tipificar amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos em nosso meio. Esta escassez de dados certamente é fruto das dificuldades (custo e disponibilidade) encontradas na obtenção de soros de referência específicos fornecidos por órgãos internacionais, para a realização da prova de soroneutralização. Dessa forma, no âmbito nacional, não há parâmetros para comparar a distribuição dos tipos de *C. perfringens* detectados pela reacção de PCR neste estudo.

A reacção de PCR avaliada demonstrou ser uma alternativa bastante eficiente na tipificação de amostras de *C. perfringens*, com a vantagem de dispensar o uso de animais e de soros anti-toxinas padrão, os quais são de difícil obtenção. Estas características poderão contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia desta bacteriose em nosso meio.

Tabela 1 - Resultados da tipificação, pela técnica de PCR, das amostras de *C. perfringens* isoladas de bovinos pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, SAA, segundo a localidade e tipo de amostra clínica.

Nº	Município/Estado	Amostra clínica	PCR
1	Barra do Pirai/RJ	Fígado	C
2	Londrina/PR	Conteúdo intestinal	C
3	Pimenta Bueno/RO	Conteúdo intestinal	C
4	Jaguaruna/SC	Fezes	C
5	Registro/SP	Fezes	A
6	Jaguaruna/SC	Intestino	C
7	Nova Rezende/MG	Intestino	A
8	Guaratinguetá/SP	Fezes	A
9	Guaratinguetá/SP	Fezes	C
10	Guaratinguetá/SP	Fezes	C
11	São José dos Campos/SP	Canela	A
12	Uberlândia/MG	Fígado	A
13	Uberlândia/MG	Coração	A
14	São Paulo/SP	Intestino	C
15	Iguape/SP	Fezes	A
16	Paragominas/PA	Rim	A
17	João Teixeira/RO	Fígado	A
18	Borborema/SP	Fígado	A
19	Nova Mutum/MT	Intestino	A
20	Guará/SP	Fígado	B
21	Buri/SP	Fígado	C
22	Guarapuava/PR	Coração	A
23	Bonfim Paulista/SP	Fígado/Rim	C
24	Guará/SP	Intestino	A
25	Itu/SP	Gânglio	A
26	Guará/SP	Fezes	C
27	Franca/SP	Fígado/Rim	C
28	Guará/SP	Intestino	C
29	Fortaleza/CE	Fígado	C
30	Guarapuava/PR	Músculo	C
31	São João da Boa Vista/SP	Fígado	A
32	Bragança Paulista/SP	Fígado	A
33	Salgado de São Felix/PB	Rim	C
34	Iacre/SP	Intestino	C
35	Jacupiranga/SP	Canela	C

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP Processo n. 02/04007-5

## REFERÊNCIAS

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K (Ed.). *Short protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

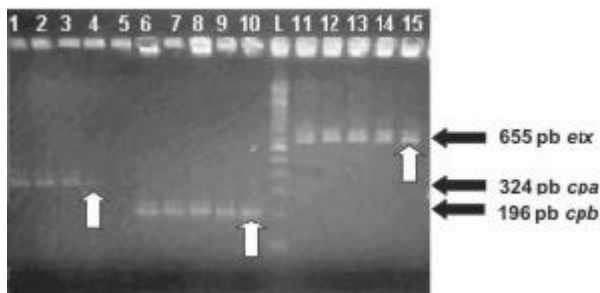


Fig. 1 - Eletroforese em Gel de Agarose demonstrando a sensibilidade analítica (setas verticais) da reação de PCR na detecção dos genes *cpa*, *cpb*, e *etx*, a partir de quantidades decrescentes de DNA bacteriano (2.270 a 227 pg/μL). Canaletas 1 a 5 = Primers para *cpa*, com sensibilidade analítica de 2,27 ng/μL. Canaletas 6 a 10 = Primers para *cpb*, com sensibilidade analítica de 227 pg/μL. Canaletas 11 a 15 = Primers para *etx*, com sensibilidade analítica de 227 pg/μL. Canaleta L = Padrão de tamanhos de fragmentos com incrementos de 100 bp. As setas horizontais apontam os amplicons correspondentes aos diferentes genes.

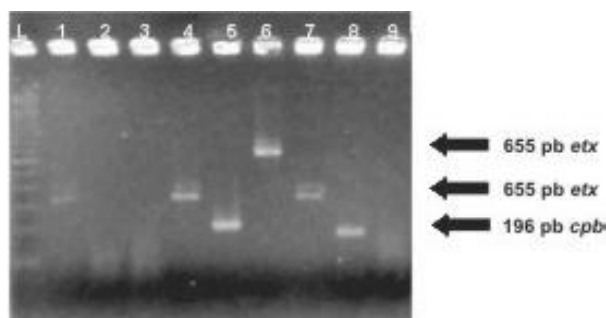


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose exemplificando a tipificação de amostras de *C. perfringens* pela técnica de PCR. Canaletas 1 a 3 = Amostra do tipo A (gene *cpa* na canaleta 1). Canaletas 4 a 6 = Amostra do tipo B (genes *cpa* na canaleta 4; *cpb* na canaleta 5 e *etx* na canaleta 6). Canaletas 7 a 9 = Amostra do tipo C (gene *cpa* na canaleta 7 e *cpb* na canaleta 8). Canaleta L = Padrão de tamanhos de fragmentos com incrementos de 100 bp. As setas horizontais apontam os amplicons correspondentes aos diferentes genes.

BALDASSI, L. *Verificação da toxigenicidade de cepas de Clostridium perfringens isoladas de material de origem bovina e sua tipificação pelo ensaio imunoenzimático e eletroforese corada para esterase*. 1998. 114p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo: 1998.

BEER, J. *Infecções e intoxicações por Clostridium perfringens*. São Paulo: Ed. Roca, 1988. Doenças infecciosas dos animais domésticos, v.2, p.234-250.

BUOGO, C.; CAPAUL, S.; HANI, H.; NICOLET, J. *Diagnosis of Clostridium perfringens type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR)*. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.42, p.51-58, 1995.

- CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques*, v.15, p.532-537, 1993.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic. *Clostridia Clinical Microbiology Reviews*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- MCDONEL, J.L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacology and Therapeutics*, v.10, p.617-655, 1980b.
- MEER, R.R. & SONGER, J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, v.58, n.7, p.702-705, 1997.
- NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *The Canadian Veterinary Journal*, v.21, n.5, p.141-148, 1980.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, v.7, n.3, p.104-110, 1999.
- ROOD, J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Reviews in Microbiology*, v.52, p.333-360, 1998.
- SMITH, L.D.S. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infectious Diseases*, v.1, n.2, p.254-260, 1979.
- STERNE, M. & BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. London: Butterworth, 1975. 144p.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; O'BOYLE, D.; KELLY, W.R. Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.23, p.13-17, 1996.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.339-344, 1997.
- VAHIEN, W.; GOLLNISCH, K.; SIMON, O.; SCHULZ, E. Development of a semiquantitative PCR assay for the detection of the *Clostridium perfringens* type C beta toxin gene in purified nucleic acid extracts from the intestinal tract of pigs. *Journal of Agricultural Science*, v.134, p.77-87, 2000.
- WALKER, P.D. *Clostridium*. In: CARTER, G.R.; COLE, J.J.R. (Eds.). *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. San Diego: Academic Press, 1990. p.220-251.
- WARREN, A.L.; UZAL, F.A.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* type D in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of goats and sheep. *Letters in Applied Microbiology*, v.29, p.15-19, 1999.

Recebido em 29/8/05

Aceito em 30/9/05