

**CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPO A PORTADORES DO GENE  
CPB-2 ASSOCIADOS À LESÕES EM ÍLEO DE COELHOS**

**D. de F.S. Campos, M.R. Baccaro, A.M. Moreno, A.J.P. Ferreira,  
D.S. Doto, D.F. Murakami, T. Knöbl, L.T. Shinya**

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Laboratório de Sanidade Suína, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: camposdfs@uol.com.br

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo verificar a patogenicidade de cultivos de amostras de *Clostridium perfringens* tipo A, portadoras do gene CPB-2 codificador da toxina beta-2. Utilizou-se o modelo de alças intestinais ligadas em coelhos, inoculadas com suspensão e filtrado de cultivos de amostras de *C. perfringens* tipo A, portadoras e não portadoras do gene CPB-2. Comparou-se os efeitos da inoculação das suspensões de culturas com os induzidos pelos filtrados destas suspensões. Obteve-se resultado estatisticamente significativo quanto à distensão das alças, a qual foi observada em 19 das 24 alças testadas com inóculos procedentes de amostras CPB-2 positivas e, em apenas uma das 12 testadas com inóculos obtidos de amostra CPB-2 negativa. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a utilização das suspensões de culturas ou de seus filtrados, no que diz respeito à distensão das alças intestinais devido à exsudação de fluido. O exame histológico dos fragmentos de íleos inoculados com suspensão e filtrado de amostras CPB-2 positivas exibiram lesões acentuadas. Os segmentos inoculados com suspensão e filtrado de amostra CPB-2 negativa e caldo BHI estéril não exibiram alterações. As cepas de *C. perfringens* tipo A, portadoras do gene codificador da toxina beta-2, demonstraram sua virulência quando inoculadas em íleo de coelho.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium perfringens* tipo A, toxinas, beta-2, diarreia, suínos.

ABSTRACT

*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TYPE-A STRAINS CARRYING THE CPB-2 GENE ASSOCIATED TO THE LESIONS IN RABBIT ILEUM. The aim of this work was to verify the pathogenicity of *Clostridium perfringens* type-A strains, carrying the CPB-2 gene, that codify the beta-2 toxin production. The rabbit ligated ileal loop model was used, inoculating culture suspensions of *C. perfringens* type-A CPB-2 carrier strains or its filtrates. The dilatation observed in 19 out of 24 loops receiving inocula from CPB-2 positive strains and in only one out of 12 loops treated with CPB-2 negative inocula constituted a significant statistical difference. There was no statistical difference in the dilatation of loops between using filtrates or bacterial suspensions. In the loops treated with suspensions of CPB-2 positive strains cultures, severe lesions were observed, and for those inoculated with filtrates of the same cultures less severe alterations were observed. In the loops inoculated with culture suspensions or filtrates from a CPB-2 negative strain and in those treated with sterile BHI broth, no histological changes were observed. The *C. perfringens* biotype-A strains carrying the CPB-2 gene, showed its virulence when inoculated into the rabbit ileum.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens* type-A, toxins, beta-2, diarrhea, swine.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Clostridium* têm sido consideradas como causa primária de doenças entéricas em diferentes espécies animais.

De acordo com as toxinas produzidas pode-se identificar cinco tipos denominados A, B, C, D e E,

estando o tipo C, produtor das toxinas beta e alfa, frequentemente associado a doenças entéricas em suínos (HATHEWAY, 1990). Os biótipos B, D e E são esporadicamente isolados do trato intestinal desses animais (SONGER, 1996).

O tipo A, foi considerado por muito tempo parte da microbiota intestinal e não patogênico, quando se

consideram apenas as doenças do trato gastrointestinal.

A toxina alfa, produzida por amostras desse tipo e codificada pelo gene CPA, não tem demonstrado capacidade de produzir doenças entéricas em leitões (SONGER & GLOCK, 1998; HERHOLZ, 1999; HATHEWAY, 1990).

Entretanto, relatos provenientes de países europeus, africanos, Estados Unidos e Brasil, têm atribuído a este tipo a causa de diarreia em leitões (SONGER, 1996; CAMPOS *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 1989).

Duas toxinas, a enterotoxina e a toxina beta-2, têm sido consideradas como potenciais fatores de virulência nas doenças entéricas relacionadas ao tipo A.

Infecções experimentais em leitões com amostras produtoras de enterotoxina, e a sua detecção em fezes de leitões com diarreia, têm demonstrado a participação desta toxina na etiologia das enterites nestes animais (SONGER & GLOCK, 1998; SONGER, 1996).

A toxina beta-2, seu gene codificador e algumas de suas propriedades biológicas foram caracterizados em 1997 (GIBERT *et al.*, 1997). Com base nesses conhecimentos, novos estudos foram realizados com o objetivo de esclarecer a importância da toxina beta-2 como possível fator de virulência. Investigações epidemiológicas utilizando fezes de suínos com e sem diarreia, demonstraram a maior ocorrência do gene CPB-2 entre os animais doentes, sugerindo ter a toxina codificada por este gene uma função relevante no processo patogênico (KLAASEN *et al.*, 1998; GIBERT *et al.*, 1997). GIBERT *et al.* (1997) também demonstrou o efeito citotóxico da toxina beta-2 em culturas de células da linhagem 1.407 e seu efeito letal em camundongos.

A relevância do tipo A como agente primário nas infecções gastroentéricas e os fatores de virulência envolvidos, ainda não se encontra completamente esclarecida, havendo a necessidade de mais pesquisas para a confirmação de seus efeitos (COLLINS *et al.*, 1989; SONGER & GLOCK, 1998; KLAASEN *et al.*, 1999; CAMPOS *et al.*, 2001).

Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento da patogenicidade da toxina beta-2 sobre o trato gastrointestinal, foi proposto comparar as alterações anatomopatológicas induzidas pela inoculação de cultivos de amostras portadoras e não portadoras do gene CPB-2 de *C. perfringens* tipo A, utilizando como modelo alças intestinais ligadas em coelhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras bacterianas

A característica das quatro amostras de *C. perfringens* utilizadas no teste encontram-se expressas na Tabela 1. Todos os isolados foram submetidos à reação da polimerase em cadeia para a detecção de genes codificadores de toxinas, incluindo o CPB-2, CPB, CPA, CPE, ETX e IA conforme descrito por GARMORY *et al.* (2000).

### Animais

Seis coelhos machos, da raça Nova Zelândia, pesando 1 – 1,5kg foram utilizados para o teste em alças intestinais ligadas. O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### Procedimento cirúrgico

Adotou-se os procedimentos descritos por DUNCAN & STRONG (1969) e TEIXEIRA *et al.* (1999).

Administrou-se 0,1 mg/kg de droperidol e citrato de fentanila (Nilperidol®) como pré-anestésico, pela via intramuscular e, em seguida anestesiou-se os animais com uma associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil®), sendo injetada a dose de 10 mg/kg, pela via intramuscular.

Procedeu-se a laparotomia para a exposição do íleo e lavagem do lúmen intestinal com injeção de 20 mL de solução fisiológica estéril, sendo realizada massagem manual para a drenagem da solução através da válvula íleo-cecal.

Preparou-se sete alças intestinais, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento, mantendo-se uma distância mínima de 5 cm entre as ligaduras das alças.

### Preparação dos inóculos

As 4 amostras bacterianas foram incubadas por 24h em caldo BHI contendo 5% de cisteína, sob condições anaeróbicas. Utilizou-se um padrão de culturas com concentração média de 10<sup>8</sup> células/mL, sendo empregado 0,5 mL como inóculo de cultura em

Tabela 1 - Descrição das amostras de *C. perfringens* utilizadas no teste de alças ligadas.

Amostra	Origem	Genes presentes
LSS-CP37/01	Isolada de fragmento intestinal de leitão com diarreia	cpa, cpb-2
LSS-CP21/01	Isolada de fragmento intestinal de leitão com diarreia	cpa, cpb-2
LSS-CPIBA/01	Coleção do Instituto Biológico de São Paulo	cpa, cpb-2
LSS-CPD2/01	Isolada de fezes de leitão sadio	cpa

suspensão. Centrifugou-se 2 mL das culturas a 8.000 rpm durante cinco minutos. Após este procedimento, filtrou-se o sobrenadante em filtro Milipore® de 0,45 µ e do produto obtido utilizou-se 0,5 mL como inóculo, livre de células vegetativas e esporos.

### Teste de alças intestinais ligadas

Cada alça previamente preparada recebeu um tipo de inóculo, conforme descrito na Tabela 2.

Após a inoculação, realizou-se a sutura da incisão, mantendo-se os animais sob o efeito de cloridrato de tramadol (Tramal®) por 12h. Decorrido esse período, os animais foram eutanasiados com uma associação de iodeto de mebezônio, embutramida e cloridrato de tetracaína (T-61®), e necropsiados para a observação macroscópica das lesões. Classificou-se como resultados positivos as alças distendidas devido a exsudação de fluido e negativo as que não exibiam este aspecto.

### Exame histopatológico

Para o exame histopatológico, foram colhidos fragmentos de alças intestinais, medindo aproximadamente dois centímetros, os quais foram mantidos em solução de formol à 10%, por 24h. Após este período, os espécimes foram desidratados em soluções de álcool em diferentes concentrações e incluídos em parafina. Obteve-se cortes de 5 µ que foram corados pela hematoxilina-eosina.

### Análise dos dados

#### Análise 1

Aplicou-se o teste qui-quadrado de Mantel-Haenszel para verificar se havia diferença entre a distensão determinada pela exsudação de fluido induzida pelos inóculos obtidos de amostras CPB-2 positivas e negativas, sem considerar a natureza do inóculo (suspensão ou filtrado).

#### Análise 2

Utilizou-se o teste exato de Fisher, não paramétrico (SIEGEL, 1956), para verificar se havia diferença entre a exsudação de fluido induzida pelos inóculos obtidos das suspensões e dos filtrados bacterianos das amostras CPB-2 positivas.

#### Análise 3

Empregou-se o teste exato de Fisher, não paramétrico (SIEGEL, 1956), para verificar se havia diferença entre a exsudação de fluido induzida pelos inóculos obtidos das suspensões e dos filtrados bacterianos da amostra CPB-2 negativa e CPA positiva (LSS-CPD2/01).

Tabela 2 - Delineamento experimental.

Animal	Alça	Amostra	Gene cpb2	Tipo de inóculo
1	1	LSS-CP37/01	+	Filtrado
	2	LSS-CP37/01	+	Suspensão
	3	LSS-CP21/01	+	Filtrado
	4	LSS-CP21/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		
2	1	LSS-CP37/01	+	Filtrado
	2	LSS-CP37/01	+	Suspensão
	3	LSS-CP21/01	+	Filtrado
	4	LSS-CP21/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		
3	1	LSS-CP37/01	+	Filtrado
	2	LSS-CP37/01	+	Suspensão
	3	LSS-CPIBA/01	+	Filtrado
	4	LSS-CPIBA/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		
4	1	LSS-CPIBA/01	+	Filtrado
	2	LSS-CPIBA/01	+	Suspensão
	3	LSS-CP37/01	+	Filtrado
	4	LSS-CP37/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		
5	1	LSS-CPIBA/01	+	Filtrado
	2	LSS-CPIBA/01	+	Suspensão
	3	LSS-CP21/01	+	Filtrado
	4	LSS-CP21/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		
6	1	LSS-CPIBA/01	+	Filtrado
	2	LSS-CPIBA/01	+	Suspensão
	3	LSS-CP21/01	+	Filtrado
	4	LSS-CP21/01	+	Suspensão
	5	LSS-CPD2/01	-	Filtrado
	6	LSS-CPD2/01	-	Suspensão
	7	Caldo BHI estéril		

## RESULTADOS

### Exame macroscópico

Os resultados do exame macroscópico, baseado na distensão das alças inoculadas, encontram-se expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado da exsudação de fluido associado à natureza do inóculo.

Análise	Natureza do inóculo	Nº. de alças distendidas	Nº. de alças sem distensão	Nº total de alças
1	Cpb-2+ <sup>a</sup>	19	5	24
	Cpb-2- <sup>b</sup>	1	11	12
		20	16	36
2	Cpb-2+ filtrado <sup>c</sup>	9	3	12
	Cpb-2+ suspensão <sup>c</sup>	10	2	12
		19	5	24
3	Cpb-2- filtrado <sup>d</sup>	1	5	6
	Cpb-2+ suspensão <sup>d</sup>	0	6	6
		1	11	12

a, b: para a análise 1, qui-quadrado Mantel-Haenszel = 15,80 e  $p < 0,001$ ; c: para a análise 2, teste exato de Fisher  $p = 0,5$ ; d: para a análise 3, teste exato de Fisher  $p = 0,5$ .

Os resultados referentes as seis alças inoculadas com caldo BHI estéril, foram considerados negativos.

Na análise 1, detectou-se uma diferença estatisticamente significativa entre inóculos CPB-2 positivos e negativos, no que se refere à propriedade de induzir

exsudação de fluido, sendo este resultado observado em dezenove das 24 alças testadas com inóculos CPB-2 positivos e, em uma alça das doze testadas com inóculo CPB-2 negativo, para o valor de  $p < 0,001$  e de qui-quadrado Mantel-Haenszel igual a 15,80.

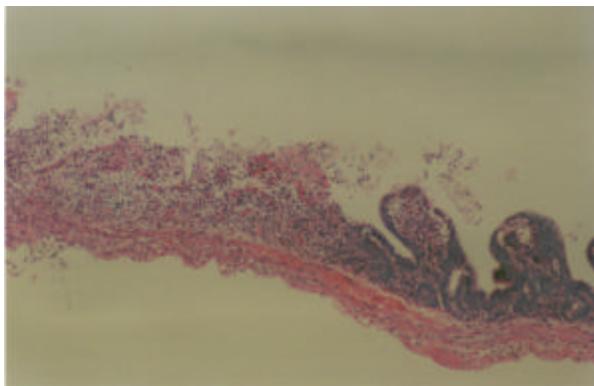


Fig. 1 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com amostra LSS-CP37/01; suspensão de cultura. Notar necrose das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. HE, 35X.

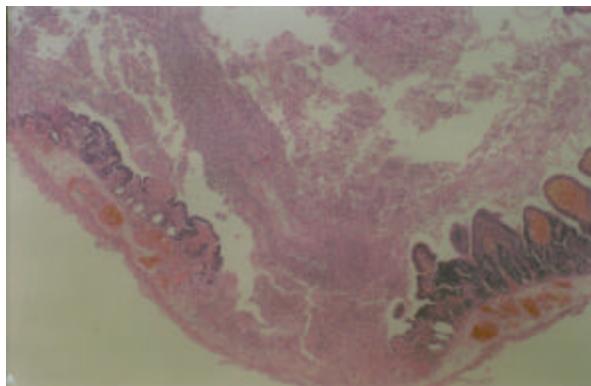


Fig. 2 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com amostra LSS-CPIBA; suspensão de cultura. Notar necrose das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. HE, 14X.

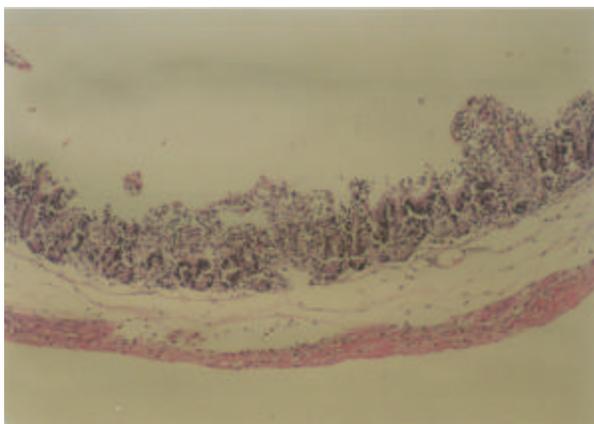


Fig. 3 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com amostra LSS-CP37/01; filtrado de cultura. Notar necrose das vilosidades e edema da submucosa. HE, 35X.

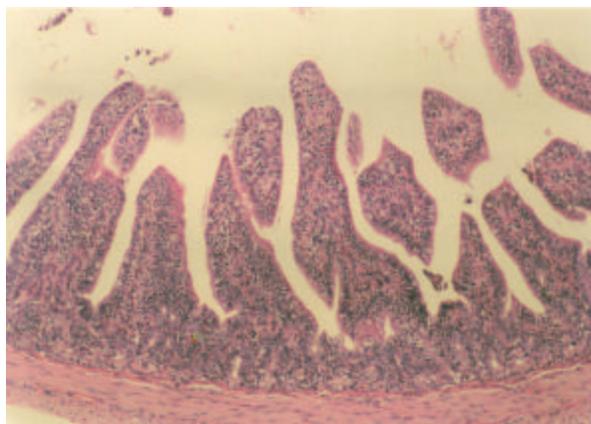


Fig. 4 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com amostra LSS-CPD2/01; suspensão de cultura. Notar ausência de lesões estruturais. HE, 35X.

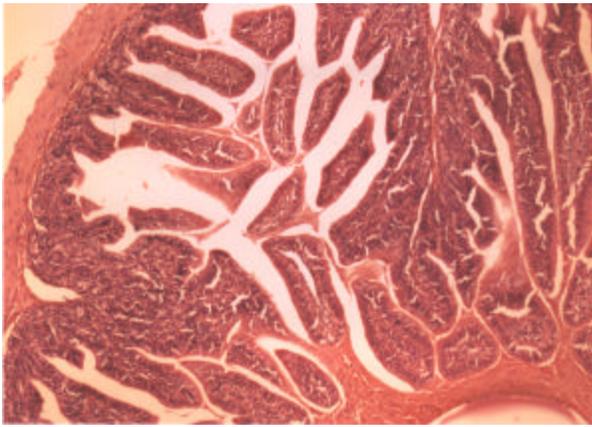


Fig.5 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com amostra LSS-CPD2/01; filtrado de cultura. Notar ausência de alterações estruturais e presença do inóculo na luz, caracterizado por substância rósea. HE, 25X.

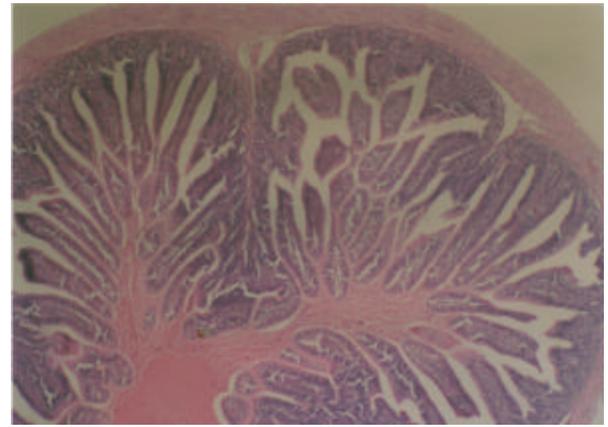


Fig.6 - Fotomicrografia de corte histológico de íleo inoculado com caldo BHI estéril. Notar ausência de alterações estruturais e presença do inóculo na luz, caracterizado por substância rósea. HE, 14X.

As análises 2 e 3, baseadas no teste exato de Fisher, não paramétrico, mostraram não haver diferença significativa entre os inóculos de amostras CPB-2 positivas e negativas.

#### Exame microscópico

Os fragmentos de íleo que receberam os inóculos CPB-2 positivos sob a forma de suspensão, revelaram lesões representadas por necrose das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figs. 1 e 2). Os espécimes inoculados com filtrado CPB-2 positivos, apresentaram necrose das vilosidades, congestão e edema da submucosa (Fig. 3).

Nos segmentos de íleos inoculados com amostras CPB-2 negativas sob a forma de suspensão ou filtrado e nos que receberam caldo BHI estéril, notou-se que os inóculos preenchiam a luz intestinal, com ausência de alterações estruturais. (Figs. 4, 5 e 6).

#### DISCUSSÃO

Tem-se questionado a relevância do *C. perfringens* tipo A, como agente etiológico responsável por doenças entéricas em suínos, especialmente, no que diz respeito a patogenicidade da toxina beta-2.

O presente estudo, revelou ser mais profusa a exsudação presente nas alças intestinais de coelhos inoculadas com as amostras CPB-2 positivas, não havendo diferença entre a inoculação sob a forma de suspensão ou filtrado. Associado a essas observações, evidenciou-se aspectos importantes a respeito das lesões causadas pela inoculação das suspensões e filtrados de amostras CPB-2 positivas. Notou-se que as alterações microscópicas relacionadas aos segmentos de íleos variaram quanto a sua intensidade,

sendo a inoculação de suspensões caracterizadas por necrose extensa e severa das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa e, as induzidas pelo filtrado, representadas por necrose das vilosidades, congestão e edema da camada submucosa. Estudos conduzidos por SONGER & GLOCK (1998) e GARMORY *et al.* (2000) descreveram alterações semelhantes às verificadas para os fragmentos inoculados com filtrados de amostras CPB-2 positivas.

Considerando que, o inóculo sob a forma de suspensão, obtido das amostras CPB-2 positivas, determinou lesões mais proeminentes do que sob a forma filtrada, pode-se supor que as células vegetativas presentes nas suspensões tenham sido as responsáveis por esta característica, devido à produção adicional de toxina. Outra possibilidade relaciona-se à instabilidade da toxina beta-2, como relatado por GIBERT *et al.* (1997), podendo a ausência de células vegetativas no inóculo filtrado, estar relacionada a lesões menos severas. Ainda, deve-se considerar a possibilidade do envolvimento de outros fatores de virulência como o fator de adesão ao epitélio intestinal, descrito por TEIXEIRA *et al.* (1999).

Em relação, aos efeitos da inoculação da suspensão e filtrado de amostras CPB-2 negativa e CPA positiva (LSS-CPD2/01), não se evidenciou lesões nas estruturas teciduais, ressaltando a participação da toxina beta-2 como fator de virulência capaz de causar lesões significativas e demonstrando não haver relação entre a toxina alfa e a presença de alterações, estando de acordo com os dados observados por DUNCAN & STRONG (1969).

Embora, a literatura apresente escassas informações sobre o assunto, pôde-se concluir diante dos resultados obtidos, que a toxina beta-2 induziu exsudação de fluido e lesões estruturais expressivas nos segmentos de íleos de coelho testados com amos-

tras de *C.perfringens* tipo A portadoras do gene CPB-2, agindo como potente fator de virulência.

#### REFERENCIASBIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, D.F.S.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BALDASSI, L.; MURAKAMI, D.F.; ANDRADE, K.A.; DOTO, D.S. Detecção do gene codificador da toxina beta-2 em amostras de *Clostridium perfringens* através da PCR. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., São Paulo. *Resumo. Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.68, supl., p.74, 2001. Resumo 095
- COLLINS, J.E.; BERGELAND, M.E.; BOULEY, D.; DUCOMMUN, A.L.; FRANCIS, D.H.; YESKE, P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.1, p.351-353, 1989.
- DUNCAN, C.L. & STRONG, G.H. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, v.100, p.86-94, 1969.
- GARMORY, H.S.; CHANTER, N.; FRENCH, N.P. BUESCHEL, D.; SONGER, J.G.; TITBALL, R.W. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta-2 toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.*, v.124, p.61-67, 2000.
- GIBERT, M.; RENAUD, C.J.; POPOFF, M.R. Beta-2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v.203, p.65-73, 1997.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, p.66-98, 1990.
- HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.2, p.358-361, 1999.
- Klaasen, L.B.M.H; Molkenboer, M.J.C.H.; Bakker, J.; Misrez, R.; Hani, H.; Frey, J.; Popoff, M.R.; Van Den Bosch, J. Detection of the beta-2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhetic piglets in the Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.24, p.325-332, 1999.
- SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill, 1956. 312p.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, p.216-234, 1996.
- SONGER, J.G. & GLOCK, R.D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. *Swine Health Prod.*, v.6, n.5, p.223-225, 1998.
- TEIXEIRA, E.P.; SERAFIM, M.B.; HOFLING, M.A.C.; YAMADA, A.T.; CASTRO, A.F.P. Adhesive properties of an outer structure of *Clostridium perfringens* type A isolated from piglets with catarrhal enteritis. *Rev. Microbiol.*, v.30, p.242-248, 1999.

Recebido em 5/7/04

Aceito em 9/8/04