

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

GENOTIPAGEM DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*  
ISOLADOS DE LEITÕES DIARRÉICOSA.A.S. Vieira<sup>1</sup>, R.M.C. Guedes<sup>2</sup>, F.M. Salvarani<sup>1</sup>, R.O.S. Silva<sup>1</sup>, R.A. Assis<sup>3</sup>, F.C.F. Lobato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br

## RESUMO

*Clostridium perfringens* é o agente responsável pela enterite necrótica em leitões, caracterizada por diarreia, perda de peso e morte. O presente estudo objetivou a tipificação de *C. perfringens* a partir de fezes de leitões diarréicos pela técnica da PCR multiplex, utilizando iniciadores específicos para os genes das toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpb-2*), épsilon (*etx*), iota (*ia*) e enterotoxina (*cpe*). Foram utilizadas 65 amostras fecais de leitões com idade variando entre sete a 36 dias. O material foi semeado em ágar gema de ovo com cicloserina. Colônias sugestivas de *C. perfringens* foram submetidas à coloração pelo método de Gram e caracterização bioquímica. Após certificado o crescimento e pureza, os clostrídios foram subcultivados em ágar sangue. Os extratos de DNA para amplificação da PCR foram obtidos por lise direta de uma colônia isolada, não sendo realizada a purificação do DNA. Bacilos anaeróbicos Gram-positivos foram isolados de 59 das 65 amostras fecais testadas. Vinte e sete foram identificadas como *C. perfringens* e tipificadas, sendo 21 (77,8%) do tipo A, cinco destas apresentavam o gene *cpb-2*; cinco (18,5%) eram do tipo C, quatro destas apresentavam o gene *cpb-2*; uma amostra (3,7%) era do tipo D e nenhuma foi positiva para o gene *ia* ou *cpe*. Neste estudo *Clostridium perfringens* tipo A foi o mais prevalente em fezes de leitões diarréicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium perfringens*, enterite necrótica, genotipagem, suínos, PCR Multiplex.

## ABSTRACT

GENOTYPING OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATED FROM DIARRHEIC PIGLETS  
*Clostridium perfringens* causes necrotic enteritis in piglets, characterized by diarrhea, weight loss and death. The purpose of this study was to genotype *C. perfringens* strains isolated from diarrheic piglets by multiplex PCR, using specific primers for genes of alpha (*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpb-2*), epsilon (*etx*), enterotoxin (*cpe*) and iota (*ia*) toxins. Sixty-five samples from diarrheic piglets ranging from 7 to 36 days of age were studied. The material was seeded into egg-yolk agar with cycloserine. Colonies with suspicion of *C. perfringens* were subjected to Gram staining and biochemical identification. After certification for purity, bacteria were subcultivated in blood agar and one single colony was used as a DNA template for PCR amplification after direct bacterial lysis. No DNA purification procedure was used. Anaerobic Gram-positive bacilli were isolated from 59 out of 65 fecal samples tested. Among these, 27 were identified as *C. perfringens* and typified by multiplex PCR. Twenty-one (77.8%) of these isolates were type A, of which 5 had the *cpb-2* gene. Five (18.5%) were type C and 4 of them contained the *cpb-2* gene. One (3.7%) was type D, while no strains were positive for *ia* or *cpe* genes. This study demonstrated that *Clostridium perfringens* A is the most common type in feces of diarrheic piglets.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens*, necrotic enteritis, genotyping, swine, multiplex PCR.

*Clostridium perfringens* é classificado em cinco tipos, de A a E, com base na produção de quatro exotoxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota. Os

tipos A e C estão entre os agentes etiológicos das enterites em leitões, enquanto os tipos B, D e E são esporadicamente isolados do trato intestinal desses

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, Setor de Clostridose, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

animais (SONGER; UZAL, 2005). Além das toxinas principais, outras como a enterotoxina e a toxina beta-2 são importantes fatores de virulência do agente (SHINYA *et al.*, 2006).

O teste *in vivo* mais comumente utilizado para tipificação de *C. perfringens* é a soroneutralização em camundongos. Apesar de reconhecido pela sua sensibilidade e especificidade, é um método demorado e relativamente caro, pois requer o uso de grande número de animais, além de gerar discussões éticas por parte de grupos humanitários e pesquisadores que visam o bem estar animal (PARREIRAS, 2002). Outro ponto limitante é a dificuldade de detecção em amostras de campo devido à instabilidade das toxinas, rapidamente degradadas por enzimas bacterianas e teciduais (SANZ *et al.*, 2007). Como alternativa aos métodos *in vivo*, amostras de *C. perfringens* podem ser tipificadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional) para detecção em separado dos genes que codificam a produção das toxinas principais alfa (*cpa*), beta (*cpb*), épsilon (*etx*), iota (*ia*) (DAUBE *et al.*, 1994; UZAL *et al.*, 1997). A técnica da PCRMultiplex é mais simples e rápida por detectar simultaneamente fragmentos gênicos das toxinas principais e das toxinas beta-2 (*cpb-2*) e enterotoxina (*cpe*) (MEER; SONGER, 1997; YOO *et al.*, 1997). Além disso, a PCR pode ser uma importante ferramenta pela possibilidade de aplicação em tecidos fixados em formalina (SANZ *et al.*, 2007).

A identificação de tipos e subtipos de *C. perfringens* é importante para o desenvolvimento e avaliação de programas de vacinação, além de auxiliar no reconhecimento da epidemiologia das infecções por esse agente (SHINYA *et al.*, 2006). Com isso, o presente estudo objetivou a tipificação de cepas de *C. perfringens* isolados a partir das fezes de leitões com diarreia pela técnica da PCRMultiplex, utilizando iniciadores específicos para os genes das toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpb-2*), épsilon (*etx*), iota (*ia*) e enterotoxina (*cpe*).

Foram trabalhadas 65 amostras fecais de suínos que apresentavam quadro clínico de diarreia, cedidas pela Perdigão Agroindustrial, Rio Verde, Goiás, Brasil. Foram enviadas, sob refrigeração, 23 amostras de fezes de animais entre sete a 21 dias, 21 de animais entre 22 a 26 dias e 21 de animais entre 27 a 36 dias. Para o isolamento, as fezes foram semeadas em ágar gema de ovo com cicloserina e incubadas em atmosfera de anaerobiose a 37° C por 48 horas. Colônias características foram avaliadas pelo método de coloração de Gram e submetidas a provas bioquímicas para confirmação (STERNE; BATTY, 1975). Após certificação da pureza e identificação, os clostrídios foram subcultivados em ágar sangue e uma colônia isolada de cada amostra foi submetida à extração térmica do DNA, a 95° C por 5 minutos, sem posterior purificação do material genético, como descrito por BAUMS *et al.* (2004).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com UZAL *et al.* (1997). Para análise, 10 mL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose, adicionados de brometo de etídeo e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA amplificado foram analisados por comparação ao marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e as amostras de referência. Como controle positivo, foram utilizadas as seguintes amostras de referência do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EUA): *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624), *C. perfringens* tipo B (ATCC 3626), *C. perfringens* tipo C (ATCC 3628), *C. perfringens* tipo D (ATCC 3629) e *C. perfringens* tipo E (ATCC 27324).

A extração térmica do DNA das amostras pela metodologia descrita por BAUMS *et al.* (2004) foi considerada prática rápida e de baixo custo para sua realização. Diversos trabalhos relatam a extração de DNA de *C. perfringens* pelo método de purificação de ácidos nucleicos (DAUBE *et al.*, 1994; SONGER; MEER, 1996; MEER; SONGER, 1997; YOO *et al.*, 1997; GARMORY *et al.*, 2000; HEIKINHEIMO; KORKEALA, 2005; SHINYA *et al.*, 2006) e, apesar de mais laborioso e dispendioso, apresenta resultados semelhantes à extração térmica realizada neste e em trabalhos anteriores (BAUMS *et al.*, 2004; HEIKINHEIMO; KORKEALA, 2005). A PCR aplicada neste estudo, descrita por UZAL *et al.* (1997), permite a amplificação simultânea de todos os genes considerados como importantes fatores de virulência na patogenicidade das enterites e enterotoxemias por *C. perfringens*. Associada à extração térmica do DNA descrita por BAUMS *et al.* (2004), a técnica demonstrou ser uma ferramenta útil e prática para tipificação no diagnóstico de rotina.

Os resultados da análise dos espécimes clínicos mostraram que em 59 das 65 amostras processadas foram encontrados bastonetes Gram-positivos anaeróbios. Destes, 27 foram identificados como *C. perfringens* por meio de provas bioquímicas. Na PCR Multiplex, observou-se que 21 (77,8%) dos isolados eram do tipo A, cinco (18,5%) do tipo C e uma (3,7%) do tipo D. Os tipos B e E não foram encontrados nas amostras analisadas. A elevada frequência encontrada para *C. perfringens* tipo A e a ausência dos tipos B e E corroboram com estudos anteriores (SONGER; GLOCK, 1998; MORENO *et al.*, 2003; SIPOS *et al.*, 2003; SHINYA *et al.*, 2006).

Com relação à faixa etária, das 27 amostras tipificadas 14 (51,8%) eram de leitões com sete a 21 dias de idade, sendo todas classificadas como *C. perfringens* tipo A. A possível explicação é o fato de que os maiores problemas de diarreia ocorrem na maternidade, fase em que há uma maior susceptibilidade dos leitões aos microrganismos causadores de diarreia e estão presentes vários fatores de risco relacionados ao ambiente e ao manejo, como desinfecção

ineficiente das baias e a não utilização de vacinas (SONGER; UZAL, 2005).

Apesar de relatos atribuindo ao *C. perfringens* tipo A a causa de diarreias em leitões (COLLINS *et al.*, 1989; COSTA *et al.*, 2004) e estudos realizados com amostras isoladas de casos de enterite necrótica demonstrarem uma maior prevalência desse biótipo (SONGER; GLOCK, 1998), a toxina alfa codificada pelo gene *cpa* não tem demonstrado capacidade de causar a doença em leitões (HATHEWAY, 1990; SONGER; GLOCK, 1998; HERHOLZ *et al.*, 1999). Na verdade, outra toxina parece estar relacionada na patogenia das doenças entéricas relacionadas ao tipo A: a toxina beta-2, codificada pelo gene *cpb-2* (WATERS *et al.*, 2003). GARMORY *et al.* (2000) e SHINYA *et al.* (2006) também demonstraram esta relação, com uma frequência do gene *cpb-2*, nos isolados de *C. perfringens* tipo A, de 83% e 100%, respectivamente. Investigações epidemiológicas utilizando fezes de suínos, com e sem diarreia, demonstraram a maior ocorrência do gene *cpb-2* entre os animais doentes, sugerindo que a toxina tenha uma função relevante no processo patogênico (GIBERT *et al.*, 1997; KLAASEN *et al.*, 1998). Em razão do aumento do número de casos relatados de enterite relacionados ao *C. perfringens* tipo A, faz-se necessário estudos sistemáticos quanto à ocorrência de amostras deste tipo e que sejam portadoras do gene da toxina beta-2 (GARMORY *et al.*, 2000). No Brasil, MORENO *et al.* (2003) descreveram a ocorrência de surtos de diarreia relacionados a amostras de *C. perfringens* tipo A contendo o gene *cpb-2* em quatro sistemas de produção de suínos. No presente estudo, o gene *cpb-2* estava presente com o gene *cpa* em 23,8% das amostras.

Das cinco amostras tipificadas como *C. perfringens* tipo C, quatro apresentavam o gene *cpb-2*. A alta ocorrência deste gene em amostras do tipo C demonstra a necessidade de mais estudos avaliando importância da toxina beta-2 e a revisão dos quadros antes creditados apenas à toxina beta (GIBERT *et al.*, 1997).

Apesar da enterotoxina ser considerada uma importante toxina envolvida em casos de infecções entéricas causadas por *C. perfringens* (SONGER; MISKIMMINS, 2004), no presente trabalho nenhuma amostra apresentou a amplificação do gene *cpe*, corroborando com estudos anteriores (VAN DAMME-JONGSTEN *et al.*, 1990; KANAKARAJET *et al.*, 1998; SHINYA *et al.*, 2006).

Pesquisas realizadas na Universidade de Iowa, avaliando a prevalência de *C. perfringens* como agente de diarreias em leitões de uma semana de idade, nos anos de 2000 e 2001, mostraram, respectivamente, 36% e 75% de incidência. A literatura científica carece de dados de diagnóstico das formas de diarreia neonatal causadas por *C. perfringens* possivelmente pelas dificuldades do isolamento desse agente e/ou pela utilização de protocolos pouco eficien-

tes na sua detecção, dificultando a avaliação da prevalência de *C. perfringens* em suínos (SONGER; UZAL, 2005).

Observa-se a ocorrência de diarreia por *C. perfringens* mesmo em plantéis vacinados, provavelmente devido à alta variabilidade genética desse agente. A tipificação pode ser uma importante ferramenta para avaliação de programas de vacinação, além de permitir o reconhecimento de amostras virulentas e identificação de surtos (SHINYA *et al.*, 2006). A genotipificação de *C. perfringens* tem simplificado o diagnóstico de rotina através da PCR Multiplex uma vez que possibilita tipificar grandes quantidades de amostras com acurácia e rapidez. Dessa forma, será possível a elaboração de programas efetivos de controle e prevenção contra as diarreias em leitões causadas por *C. perfringens*.

#### AGRADECIMENTO

Agradecemos ao CNPq e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.100, p.11-16, 2004.
- 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. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.1, p.351-353, 1989.
- COSTA, G.M.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. Diarreia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, p.401-404, 2004.
- DAUBE, G.; CHINA, B.; SIMON, P.; HVALA, K.; MAINIL, J. Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. *Journal of Applied Bacteriology*, v.77, p.650-655, 1994.
- 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. *Epidemiology and Infection*, v.124, p.61-67, 2000.
- GIBERT, M.; JOLIVET-REYNAUD, C.; 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. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, p.66-98, 1990.
- HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chicken. *Letters in Applied Microbiology*, v.20, p.407-411, 2005.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.358-361, 1999.
- KANAKARAJ R.; HARRIS D.L.; SONGER J.G.; BOSWORTH B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and swine feed. *Veterinary Microbiology*, v. 63, p.29-38, 1998.
- KLAASEN, H.L.; MOLKENBOER, M.J.; BAKKER, J.; MISEREZ, R.; HÄNLI, H.; FREY, J.; POPOFF, M.R.; VAN DEN BOSCH, J.F. Detection of the beta-2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.325-332, 1999.
- MEER, R.R.; SONGER, J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, v.58, p.702-705, 1997.
- MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; FERREIRA, A.J.P.; HIROSE, F.; CAMPOS, D.S. Detection of the beta-2 toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrhoeic piglets. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.70, n.2, p.135-138, 2003.
- PARREIRAS, P.M. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* tipo D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, p.328-330, 2002.
- SANZ, M. G., VENTURINI, L., ASSIS, R, A. Fibrinonecrotic enteritis in piglets in a commercial farm: a post mortem study of prevalence and the role of lesion associated agents *Isospora Suis* and *Clostridium perfringens*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, p.397-400, 2007.
- SHINYA, L.T.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Clostridium perfringens* isolated from diarrhoeic piglets. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.385-389, 2006.
- SIPOS W.; FISCHER L.; SCHINDLER M.; SCHMOLL F. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestic end exotic ruminants end swine. *Journal of Veterinary Medicine*, v.50, p.360-362, 2003.
- SONGER, J.G.; MEER, R.R. Genotyping of *Clostridium perfringens* by Polymerase Chain Reaction: an adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe*, v.2, p.197-203, 1996.
- SONGER, J.G.; GLOCK, R.D.; Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. *Swine Health and Production*, v.6, n.5, p.223-225, 1998.
- SONGER, J.G.; MISKIMMINS, D.W. *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe*, v.10, p.239-242, 2004.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.528-536, 2005.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic clostridia*. London: Butterworth, 1975. 139p.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in feces of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.339-344, 1997.
- VAN DAMME-JONGSTEN M.; HAAGSMA J.; NOTERMANS S. Testing strains of *Clostridium perfringens* type A isolated from diarrhoeic piglets for the presence of the enterotoxin gene. *Veterinary Record*, v.24, p.191-192, 1990.
- YOO, H.S.; LEE, S.U.; PARK, K.Y.; PARK, Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.228-232, 1997.
- WATERS M.; SAVOIE A.; GARMORY H.S.; BUESCHEL D.; POPOFF M.R.; SONGER J.G.; TITBALL R.W.; MCCLANE B.A.; SARKER M.R. Genotyping and phenotyping of beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.3584-3591, 2003.

Recebido em 13/11/07  
Aceito em 6/11/08