

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da diversidade genética e potencial toxigênico de cepas de *Clostridium perfringens* isoladas de alimentos, solo e animais.

André Kenji Otuki

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

André Kenji Otuki

Avaliação da diversidade genética e potencial toxigênico de cepas de
Clostridium perfringens isoladas de alimentos, solo e animais.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientadora/presidente

Prof. Dr. Mario Julio Avila Campos
1º. examinador

Prof. Dra. Mariza Landgraf
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais, Tutomu e Maria, e aos meus irmãos, Alexandre e Rafael,
pelo apoio, carinho e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Teresa Destro pela orientação, amizade, dedicação e oportunidade de aprendizado.

À Prof. Dra. Mariza Landgraf pelo convívio e sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pelo apoio e ensinamentos transmitidos.

À Dra. Lucia Baldassi e às pesquisadoras Simone Miyashiro e Alessandra Nassar (Instituto Biológico) pela imensa contribuição a esse trabalho e por sempre me receberem em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Francisco Lobato e Felipe Massiero, pela disponibilização de cepas padrão.

Aos Dr. Mario Killner e Dr. Laercio Goulart, da SFDK Laboratório de Análise de Produtos, pela disponibilização dos isolados bacterianos provenientes de alimentos.

À minha amiga Juliana Saito pela disponibilização dos isolados bacterianos.

Ao meu amigo Carlos Henrique Tersarotto pela disponibilização dos isolados bacterianos e principalmente pela amizade e apoio.

Aos meus pais, Tutomu e Maria, que nunca mediram esforços para que eu fosse adiante.

Aos meus irmãos Alexandre e Rafael, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

Ao amor da minha vida, Gabriela, por todo amor, dedicação e companhia em todos os momentos.

Aos queridos amigos Ana, Ângela, Cecília, Kátia, Maria Crystina, Graciela, Matheus, Tati, Vanessa e Vinicius, pela amizade, pelos muitos momentos de descontração e por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos queridos amigos Adriana, Anderson, Denise, Danielle, Flávia, Hans, Janaina, Joyce, Keila, Lúcia, Marina, Marildes, Mayra, Monika, Svetoslav, Verena, Verônica, Priscila, pela amizade e troca de conhecimentos.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Mônica, Cleonice e Edílson da secretaria do departamento pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-Graduação pela atenção dedicada e serviços prestados, e pelos muitos “galhos” quebrados.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudos e apoio financeiro para desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho de pesquisa.

Muito Obrigado!

ÍNDICE

Lista de Tabelas	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Anexos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Gênero <i>Clostridium</i>	1
1.2. <i>Clostridium perfringens</i>	1
1.2.1. Características gerais	1
1.2.2. Características gerais das principais toxinas produzidas por <i>C. perfringens</i>	3
1.3. Doenças causadas por <i>C. perfringens</i>	10
1.3.1. Enterite necrótica	10
1.3.2. Toxi-infecção causada por <i>C. perfringens</i> tipo A	11
1.4. Surtos de toxi-infecção alimentar causados por <i>C. perfringens</i>	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.1.1. Cepas padrão	16
3.1.2. Obtenção dos isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de alimentos	16
3.1.3. Obtenção dos isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de solo	16
3.1.4. Obtenção de isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de fezes de animais	17
3.2. Métodos	17
3.2.1. Verificação da pureza dos isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de alimentos	17
3.2.2. Isolamento de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de solo	18

3.2.3. Isolamento de clostrídios sulfito redutores provenientes de amostras de fezes de animais.....	18
3.2.4. Identificação bioquímica de <i>C. perfringens</i>	19
3.2.4.1. Teste de fermentação tempestuosa em meio leite com ferro	19
3.2.4.2. Testes de motilidade e redução do nitrato	19
3.2.4.3. Testes de fermentação de lactose e liquefação de gelatina	20
3.2.4.4. Interpretação dos resultados bioquímicos.....	20
3.2.5. Identificação dos tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i> e detecção da presença do gene <i>cpe</i>	20
3.2.5.1. Extração e quantificação do DNA total.....	20
3.2.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese	21
3.2.5.3. Determinação da localização do gene <i>cpe</i> em cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A.....	22
3.2.6. Avaliação da relação genética dos isolados de <i>C. perfringens</i>	24
3.2.6.1. Preparo da suspensão celular e dos blocos de agarose	24
3.2.6.2. Lise celular e lavagens.....	25
3.2.6.3. Restrição enzimática.....	25
3.2.6.4. Eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE).....	25
3.2.6.5. Análise dos resultados	26
3.2.7. Detecção de enterotoxina	26
3.2.7.1 Obtenção de enterotoxina.....	26
3.2.7.2. Avaliação da presença de enterotoxina	26
3.2.7.3. Interpretação dos resultados.....	27
4. RESULTADOS E COMENTÁRIOS	28
4.1. Identificação bioquímica de <i>C. perfringens</i> em isolados provenientes de amostras de alimentos	28
4.2. Identificação bioquímica de <i>C. perfringens</i> em isolados provenientes de amostras de solo.....	30
4.3. Identificação bioquímica de <i>C. perfringens</i> em isolados provenientes de amostras de fezes de animais	32
4.4. Identificação dos tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i> e detecção da presença do gene <i>cpe</i>	34

4.5. Determinação da localização do gene <i>cpe</i> em cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A.....	37
4.6. Análise do perfil de macro-restrição do DNA após eletroforese em campo pulsado (PFGE)	40
4.7. Detecção de enterotoxina	46
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos, utilizados na reação multiplex PCR para tipagem do *C. perfringens*, segundo *Baums et al. (2004)*.....22
- Tabela 2.** Seqüência dos oligonucleotídeos, utilizados na reação multiplex PCR para determinação da localização do gene *cpe* em cepas *C. perfringens*, segundo *Miyamoto et al. (2004)*.....23
- Tabela 3.** Isolados de clostrídios sulfito redutores e freqüência de *Clostridium perfringens* em alimentos submetidos às análises rotineiras e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.28
- Tabela 4.** Relação das amostras de alimentos, identificação e número de isolados de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* em alimentos submetidos às análises rotineiras e em alimentos suspeitos de causarem toxi-infecções alimentares.....29
- Tabela 5.** Relação dos isolados de clostrídios sulfito redutores e freqüência de *Clostridium perfringens* provenientes de amostras de solo.....31
- Tabela 6.** Relação dos isolados de clostrídios sulfito redutores e freqüência de *Clostridium perfringens* provenientes de fezes de ovinos e bovinos.....33
- Tabela 7.** Total de isolados de *Clostridium perfringens* tipo A e a freqüência de *Clostridium perfringens* tipo A enterotoxigênico em alimentos submetidos às análises rotineiras e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção 35
- Tabela 8.** Localização do gene *cpe* em amostras de *C. perfringens* isolados de alimentos submetidos as análises rotineiras e de alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.38
- Tabela 9.** Relação dos perfis genéticos obtidos através da análise por PFGE após restrição enzimática com *Sma*I em cepas de proveniente de alimentos, solo e fezes de ovinos e bovinos.43

Tabela 10. Detecção de enterotoxina de <i>C. perfringens</i> em cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A portadoras do gene <i>cpe</i> em alimentos submetidos às análises rotineiras e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.	46
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama esquemático mostrando as principais etapas envolvidas no mecanismo de intoxicação alimentar por *C. perfringens*.....7
- Figura 2.** Modelo esquemático da configuração dos complexos pequenos e grandes formados pela CPE.....8
- Figura 3.** Localização de seqüências de inserção específicas em isolados de *Clostridium perfringens* tipo A em relação a localização do gene *cpe* 10
- Figura 4.** Ilustração dos perfis de aglutinação apresentado pelo kit PET RPLA.....27
- Figura 5.** Tipagem de *C. perfringens* empregando-se Multiplex PCR, segundo Baums *et al.* (2004) com modificações35
- Figura 6.** Detecção do gene *cpe*.....36
- Figura 7.** Determinação da localização do gene *cpe* de *C. perfringens* empregando-se Multiplex PCR, segundo Miyamoto *et al.*.....38
- Figura 8.** Representação da relação genética de 69 perfis PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) de cepas de *C. perfringens*, obtidos após digestão do DNA com a enzima *Sma*I.....45

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Meio lactose gelatina.....	55
Anexo 2 – Meio motilidade nitrato	55
Anexo 3 – Reagente A	55
Anexo 4 – Reagente B	55
Anexo 5 – Meio Duncan and Strong modificado	56

RESUMO

OTUKI, A.K. **Avaliação da diversidade genética e potencial toxigênico de cepas de *Clostridium perfringens* isoladas de alimentos, solo e animais.** 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Clostridium perfringens é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos. Este microrganismo pode ser classificado em cinco tipos toxigênicos (A-E), de acordo com a detecção dos genes codificadores de suas principais toxinas: alfa (*cpa*), beta (*cpb*), épsilon (*etx*) e iota (*iap*), sendo que técnicas moleculares empregando a PCR são atualmente utilizadas para genotipagem desses isolados. Alguns isolados de *C. perfringens* produzem uma enterotoxina (CPE) que é responsável pelos sintomas clínicos desenvolvidos em casos de toxinfecção alimentar, sendo que esta toxina é codificada pelo gene *cpe*. A simples detecção de *C. perfringens* em um alimento, mesmo naqueles suspeitos de causar surtos, não é suficiente para considerá-lo como de risco à saúde do consumidor. Isto porque dentre os isolados de *C. perfringens* apenas um número muito pequeno apresenta o gene *cpe*. Além disso, isolados de *C. perfringens* não produtores de CPE estão amplamente disseminados no ambiente, em alimentos e mesmo em fezes de pessoas. Desta forma, com o presente estudo verificou-se a freqüência de *C. perfringens* dentre isolados de clostrídios sulfito redutores, a freqüência de *C. perfringens* potencialmente enterotoxigênicos e sua variabilidade genética, de modo a evidenciar a importância dessas cepas como causadoras de doenças, além de fornecer subsídios para melhorar os conhecimentos sobre as características das cepas circulantes em nosso meio. Foram utilizados 335 isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de alimentos (126), solo (84) e fezes de animais (125). Dos 335 isolados, 146 (43,6%) foram caracterizados, através de reações bioquímicas e moleculares, como *C. perfringens*, sendo 75 isolados (59,5%) provenientes de alimentos, 43 (51,2%) de solo e 28 (22,4%) de fezes de animais. Todas as cepas de *C. perfringens* analisadas foram tipadas como *C. perfringens* tipo A. Dos 75 isolados de *C. perfringens* provenientes de alimentos, 20 apresentaram o gene *cpe*, sendo 13 (65%) com localização cromossomal; nas demais cepas não foi possível determinar sua localização. Nos isolados de *C. perfringens* provenientes de solo e das fezes de animais não se verificou a presença desse gene. Das 20 cepas de *C. perfringens* que apresentaram o gene *cpe* detectou-se em 15 a produção de enterotoxina; as cinco cepas restantes não apresentaram esporulação no meio DUNCAN STRONG modificado, não sendo possível avaliar sua atividade enterotoxigênica. As 146 cepas de *C. perfringens* quando submetidas à PFGE geraram 69 perfis PFGE distintos, sendo 42 exclusivos para uma única cepa, indicando uma grande variabilidade genética, entre isolados provenientes de amostra de alimentos, fezes ou solo. A utilização de clostrídios sulfito redutores, ou mesmo de *C. perfringens* como indicador de possível risco à saúde dos consumidores pode levar à condenação

desnecessária de alimentos, uma vez que existe baixa correlação entre clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*, independente da fonte de isolamento, além da baixa frequência do gene *cpe* nas cepas estudadas.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*, CPE, diversidade genética.

ABSTRACT

OTUKI, A.K. **Evaluation of genetic diversity and potential toxigenic strains of *Clostridium perfringens* isolated from food, soil and animals.** 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Clostridium perfringens is one of the most frequently microorganism involved in outbreaks of foodborne diseases. This microorganism can be classified into five toxigenic types (A to E), according to the detection of genes encoding its major toxins: alpha (*cpa*), beta (*cpb*), epsilon (*etx*) and iota (*iap*). Molecular techniques using PCR are currently used for genotyping this isolates. Besides the major toxins, some isolates of *C. perfringens* produce an enterotoxin (CPE) that is responsible for clinical symptoms developed in cases of food poisoning. This enterotoxin is encoded by the *cpe* gene. The simple detection of *C. perfringens* in food, even in those suspected of causing outbreaks, is not enough to consider it as a risk to consumers' health. This happens because among the isolates of *C. perfringens* only a very small number shows the *cpe* gene. In addition, isolates of *C. perfringens* that do not produce CPE are widespread in the environment, food and even in feces of humans. Thus, the present study examined the frequency of *C. perfringens* isolates among sulfite reducing clostridia, the frequency of potentially enterotoxigenic *C. perfringens* and its genetic variability in order to highlight the importance of these strains in causing diseases, and provides subsidies to improve the knowledge about the strains that are circulating in our environment. A total of 335 isolates of sulfite reducing clostridia from foods (126), soil (84) and animal feces (125) were used. Among the 335 isolates, 146 (43.6%) were characterized by biochemical and molecular reactions as *C. perfringens*, being 75 (59.5%) from foods, 43 (51.2%) from soil and 28 (22.4%) from animal feces. All strains of *C. perfringens* were typed as *C. perfringens* type A. Of the 75 isolates of *C. perfringens* from food, 20 had the *cpe* gene, and in 13 (65%) the gene was chromosomally located. In the other strains it was not possible to determine the location of this gene. In isolates of *C. perfringens* from soil and animal feces the *cpe* gene was not present. Amongst the 20 strains of *C. perfringens* positive for *cpe*, enterotoxin production was detected in 15. Five strains showed no sporulation in the medium modified Duncan Strong, being not possible to verify their enterotoxigenic activity. All *C. perfringens* were subjected to PFGE and generated 69 different PFGE profiles, being 42 unique to a single strain, indicating a great genetic variability among isolates from food, feces or soil. The use of sulfite reducing clostridia, or even *C. perfringens* as an indicator of possible health risk to consumers can lead to unnecessary condemnation of food, since there is low correlation between sulfite reducing clostridia and *C. perfringens*, regardless of source of isolation. This study also shows a low frequency of *cpe* gene in the strains indicating the low risk in causing foodborne disease.

Keywords: *Clostridium perfringens*, CPE, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Clostridium*

O gênero *Clostridium* é extremamente amplo e heterogêneo, composto por bacilos gram-positivos de 0,3 a 2,0 x 1,5 a 20,0 µm, esporulados, e que apresentam motilidade por flagelos peritríquios, com exceção de *Clostridium perfringens* que não apresenta flagelos (HOLT *et al.*, 1994). Podem ser encontrados em água, solo, vegetação e trato gastrointestinal de mamíferos. Dentre as mais de 150 espécies pertencentes ao gênero, 35 são consideradas patogênicas, sendo 15 produtoras de toxinas potentes de natureza protéica. Essas bactérias produzem um total de 58 toxinas, ou seja, 18% das 357 toxinas bacteriana conhecidas, sendo assim, considerado o gênero bacteriano mais toxigênico (POPOFF e STILES, 2005).

Com relação às espécies produtoras de toxinas, pode-se destacar: *C. argentinense*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. chauvoei*, *C. difficile*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. spiroforme*, *C. tetani* e *C. perfringens* (HATHEWAY, 1990). Doenças como botulismo, tétano, gangrena gasosa, toxi-infecção alimentar e colite pseudomembranosa são algumas das doenças causadas por espécies deste gênero.

1.2. *Clostridium perfringens*

1.2.1. Características gerais

Welch e Nuttall (1892) foram os primeiros a relatar a existência da espécie *Clostridium perfringens*, entretanto, inicialmente denominaram-na *Bacillus aerogenes capsulatus*. Diversas nomenclaturas como *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii*, *Bacterium welchii*, *Clostridium welchii* entre outros, foram utilizadas para descrever este microrganismo, até que a denominação atual fosse estabelecida (SKERMAN *et al.*, 1980).

Inicialmente, este microrganismo foi identificado como importante agente etiológico em casos de gangrena gasosa, principalmente em ferimentos em soldados durante a primeira guerra mundial (SHIMIZU *et al.*, 2002). A partir da

década de 40 é que se demonstrou a importância de *C. perfringens* como agente etiológico em casos de toxi-infecções alimentares (McCLUNG, 1945).

C. perfringens é um microrganismo esporulado que se multiplica em temperaturas entre 15 e 50°C, sendo a temperatura ideal para a maioria das cepas de 45°C (BRYNESTAD e GRANUM, 2002). Possuem ainda como características a capacidade de reduzir nitrato, fermentar glicose, lactose, maltose, sacarose e outros carboidratos, e liquefazer gelatina (HATHEWAY, 1990).

Apesar de necessitar de uma atmosfera anaeróbia para sua multiplicação, esta espécie, diferentemente dos outros clostrídios, apresenta uma tolerância à exposição ao ar atmosférico e necessita apenas de uma moderada redução no potencial de óxido-redução (Eh) para se multiplicar (McCLANE, 2007).

C. perfringens pode sobreviver em condições físico-químicas adversas, por diferenciação da célula bacteriana vegetativa em esporo. Em geral, esporos de *C. perfringens* resistem às condições ambientais adversas, como variações de temperatura, dessecação e até mesmo ação de compostos tóxicos. A inativação de células vegetativas ocorre a 60°C, porém, seus esporos podem sobreviver por até 1 hora na temperatura de 100°C (McCLANE, 2007).

Esporos de diferentes cepas podem diferir em sua resistência ao calor. Weiss e Strong (1967) determinaram a resistência térmica a 100°C de quatro cepas de *C. perfringens* e verificaram que o valor-D a essa temperatura variou entre 0,31 e 17,6 minutos, mostrando que esporos de algumas cepas apresentam uma maior resistência térmica que outras.

É importante ressaltar que a cocção inadequada de alimentos, além de não reduzir a quantidade de esporos de *C. perfringens* nos alimentos, pode induzir a germinação desses esporos e favorecer o seu desenvolvimento. Após a germinação, o número de *C. perfringens* em um alimento pode aumentar rapidamente, pois em condições adequadas esse microrganismo pode apresentar um tempo de geração extremamente curto (< 10 minutos para alguns isolados) (McCLANE, 2007).

Devido ao rápido tempo de geração e formação de esporos resistentes a diversas condições de estresse, *C. perfringens* é conhecido como um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA).

C. perfringens é classificado em cinco tipos toxigênicos: A, B, C, D e E, sendo esta classificação baseada na capacidade desse microrganismo em produzir diferentes exotoxinas [toxinas alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) e iota (ι)]. O tipo A produz apenas a toxina alfa, o tipo B as toxinas alfa, beta e épsilon, o tipo C as toxinas alfa e beta, já o tipo D as toxinas alfa e épsilon e, por último, o tipo E produz as toxinas alfa e iota. Além dessas toxinas utilizadas na tipagem, pelo menos outras 10 toxinas podem ser produzidas, entre elas, a enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) (HATHEWAY, 1990; ROOD, 1998).

A identificação dos grupos toxigênicos A, B, C e D foi estabelecida por Wildson em 1931; já o grupo toxigênico E foi determinado por Bosworth em 1943 (HATHEWAY, 1990). A tipagem desses grupos é classicamente baseada na soroneutralização *in vivo* da toxina, utilizando antisoros tipo-específicos (ORR e REED, 1940). Entretanto, os métodos moleculares vêm substituindo os métodos clássicos de tipagem de *C. perfringens*, pois reduzem custos, tempo de análise e principalmente eliminam o uso de animais de laboratório (MEER e SONGER, 1997; BAUMS *et al.*, 2004).

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a tipagem de *C. perfringens* pela detecção dos genes *cpa*, *cpb* e *etx*, codificadores para as toxinas alfa, beta e épsilon, respectivamente e dos genes, *iap* e *ibp*, codificadores da toxina iota (BAUMS *et al.*, 2004). A PCR também possibilita detectar cepas de *C. perfringens* potencialmente enterotoxigênicas, ou seja, cepas portadoras do gene *cpe*, codificador para enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) (WEN e McCLANE, 2004).

1.2.2. Características gerais das principais toxinas produzidas por *C. perfringens*

1.2.2.1. Toxina Alfa

A toxina alfa é uma fosfolipase C codificada pelo gene cromossomal *cpa*, sendo produzida por todas as cepas de *C. perfringens*. Cepas diferentes de *C. perfringens* produzem quantidades diferentes dessa toxina, sendo as cepas do tipo A, geralmente, as maiores produtoras (TSUTSUI *et al.*, 1995; BULLIFENT *et al.*,

1996). Essa fosfolipase C é a principal toxina envolvida na gangrena gasosa (HATHEWAY, 1990).

As fosfolipases C bacterianas são um grupo heterogêneo de proteínas. A toxina alfa produzida pelo *C. perfringens* é a mais tóxica dentre elas, apresentando atividades miotóxica, citotóxica, hemolítica e capacidade de agregar plaquetas (FLORES-DIAZ *et al.*, 2004).

A fosfolipase C apresenta tanto atividade lecitínásica quanto esfingomielinásica, degradando assim componentes externos de membranas de células eucarióticas (FLORES-DIAZ *et al.*, 2004). A hidrólise da membrana fosfolipídica resulta em uma cascata de reações, tais como: processo inflamatório, contração muscular, alteração na modulação e crescimento celular, agregação de plaquetas, dano na membrana celular, entre outras (TITBALL *et al.*, 1999).

1.2.2.2. Toxina beta

A toxina beta é codificada pelo gene plasmidial *cpb*, sendo produzida por *C. perfringens* tipos B e C. Essa toxina apresenta peso molecular de 40 kDa, é termolábil e sensível à tripsina (SAKURAI e DUNCAN, 1978). O seu mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido. Entretanto, sabe-se que a toxina beta forma poros com seletividade para cátions, como o sódio e o potássio, em células susceptíveis (SHATURSKY *et al.*, 2000). Já em células endoteliais de suínos, a toxina pode induzir necrose vascular, hemorragia e hipoxia do tecido necrosado (MICLARD *et al.*, 2009).

A toxina beta produzida pelo *C. perfringens* tipo C é responsável por enterite necrótica em humanos e animais (HATHEWAY, 1990).

1.2.2.3. Toxina épsilon

Após a neurotoxina botulínica e a toxina tetânica, a toxina épsilon é a toxina mais potente produzida pelo gênero *Clostridium*. Esta toxina é codificada pelo gene *etx*, localizado em plasmídeos, e é produzida por cepas de *C. perfringens* tipo B e D (SONGER, 1996).

A toxina épsilon é secretada como uma prototoxina inativa, composta por 311 aminoácidos e com peso molecular de 34,3 kDa. A sua ativação ocorre pela ação de enzimas proteolíticas produzidas pelo próprio microrganismo, como as toxinas kappa ou lambda, ou por quebras proteolíticas que podem ocorrer no sistema gastrointestinal do hospedeiro, principalmente pela ação da tripsina e da quimotripsina (SOLER-JOVER *et al.*, 2004).

Essa toxina, quando presente no intestino, aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal e se dissemina para outros órgãos através do sistema circulatório, causando aumento na pressão sangüínea e na permeabilidade vascular, edema pulmonar, necrose hepática e edema nas meninges (SONGER, 1996; ROOD, 1998; SOLER-JOVER *et al.*, 2004; POPOFF e STILES, 2005).

A toxina épsilon produzida por *C. perfringens* tipo B e D é responsável por enterotoxemia, principalmente em ovinos e caprinos (SONGER, 1996).

1.2.2.4. Toxina iota

A toxina iota é produzida apenas por cepas de *C. perfringens* tipo E (HATHEWAY, 1990). Essa toxina, diferentemente das demais toxinas produzidas por *C. perfringens*, é constituída por dois polipeptídeos, designados Ia e Ib que são codificados pelos genes *iap* e *ibp*, respectivamente, sendo ambos os genes plasmidiais. Para que a toxina iota apresente atividade biológica, é necessário que ambos os componentes estejam presentes e que sejam ativados, pela clivagem por ação de protease (STILES e WILKINS, 1986; BLÖCKER *et al.*, 2001).

O componente Ib se liga aos receptores da superfície celular e transloca o componente Ia para o citosol celular (BLÖCKER *et al.*, 2001). No interior da célula, o componente Ia causará a despolimerização dos filamentos de actina e inibição das funções celulares que dependem do citoesqueleto de actina (PETIT *et al.*, 1999).

Essa toxina é responsável por enterotoxemia em bovinos e outros animais jovens (POPOFF e STILES, 2005).

1.2.2.5. Enterotoxina de *C. perfringens* (CPE)

A CPE é uma proteína citotóxica, composta por 319 aminoácidos, com peso molecular de 35 kDa (CZEUZULIN *et al.*, 1993). Essa enterotoxina é termolábil, perdendo sua atividade biológica quando exposta a 60°C por 10 minutos, mas é resistente à papaína, quimotripsina e tripsina (STARK e DUNCAN, 1971).

Essa enterotoxina pode ser produzida por qualquer um dos cinco tipos de *C. perfringens*, entretanto, o tipo A é o mais freqüentemente associado à sua produção (BRYNESTAD e GRANUM, 2002).

A produção da CPE ocorre no citoplasma da célula bacteriana, durante o processo de esporulação no intestino, sendo liberada na lise do esporângio, juntamente com a liberação do esporo (DUNCAN, 1973; DUNCAN *et al.*, 1973, CZEUZULIN *et al.*, 1993). A associação entre a esporulação e a produção de enterotoxina foi demonstrada pela inativação do fator transcricional *spo0A*, responsável pelo início do processo de esporulação, em cepas de *C. perfringens* tipo A enterotoxigênicas. Nessas cepas foram observadas não só a ausência de esporulação, como a ausência de produção de CPE (HUANG *et al.*, 2004).

A ação citotóxica da CPE em células de mamíferos envolve sua ligação com receptores protéicos específicos presentes na membrana das células intestinais. Dentre essas proteínas destacam-se as claudinas, componentes essenciais das *tight junctions*. Na figura 1 encontra-se a proposta de Brynestad e Granum (2002) para a ação da CPE. A CPE juntamente com uma proteína receptora formará um complexo pequeno. Esse complexo pode se ligar a proteínas, não identificadas, de 50 kDa, presentes na membrana intestinal e sofrer uma alteração conformacional. Após a alteração física este irá interagir com outra proteína presente na membrana intestinal, também não identificada, de aproximadamente 70 kDa, formando um complexo grande de aproximadamente 155 kDa. Este complexo resultará na formação de um poro, que ocasionará em aumento da permeabilidade da membrana das células intestinais a moléculas pequenas (<200 Da), como aminoácidos, íons, nucleotídeos, entre outras. A perda dessas substâncias leva à inibição da síntese de macromoléculas e resulta em efeitos citopáticos, alterando a morfologia celular, a permeabilidade para moléculas maiores e causando a lise celular, resultando em diarreia (BRYNESTAD e GRANUM, 2002; POPOFF e STILES, 2005).

Além do complexo grande de aproximadamente 155 kDa, pode ser formado um outro complexo de aproximadamente 200kDa. A composição e formação deste complexo não está bem esclarecida, entretanto, sabe-se que a ocludina, principal proteína estrutural das *tight junctions*, está presente neste complexo (POPOFF e STILES, 2005). Com a remoção das proteínas ocludinas das *tight junctions*, ocorre um aumento da permeabilidade paracelular, contribuindo para o aumento da diarreia (WIECKOWSKI *et al.*, 1994; KOKAI-KUN e McCLANE, 1997; McCLANE, 2001).

Robertson *et al.* (2007) propuseram um novo modelo para a configuração dos complexos grandes formados pela CPE (figura 2). Estes autores demonstraram que a massa molecular dos complexos grandes, anteriormente estimadas em 155 kDa e de 200 kDa, na verdade apresentam aproximadamente 450 e 600 kDa, respectivamente. O grande aumento na massa molecular dos complexos pode ser explicado pela formação de estruturas hexoméricas, com seis moléculas de CPE.

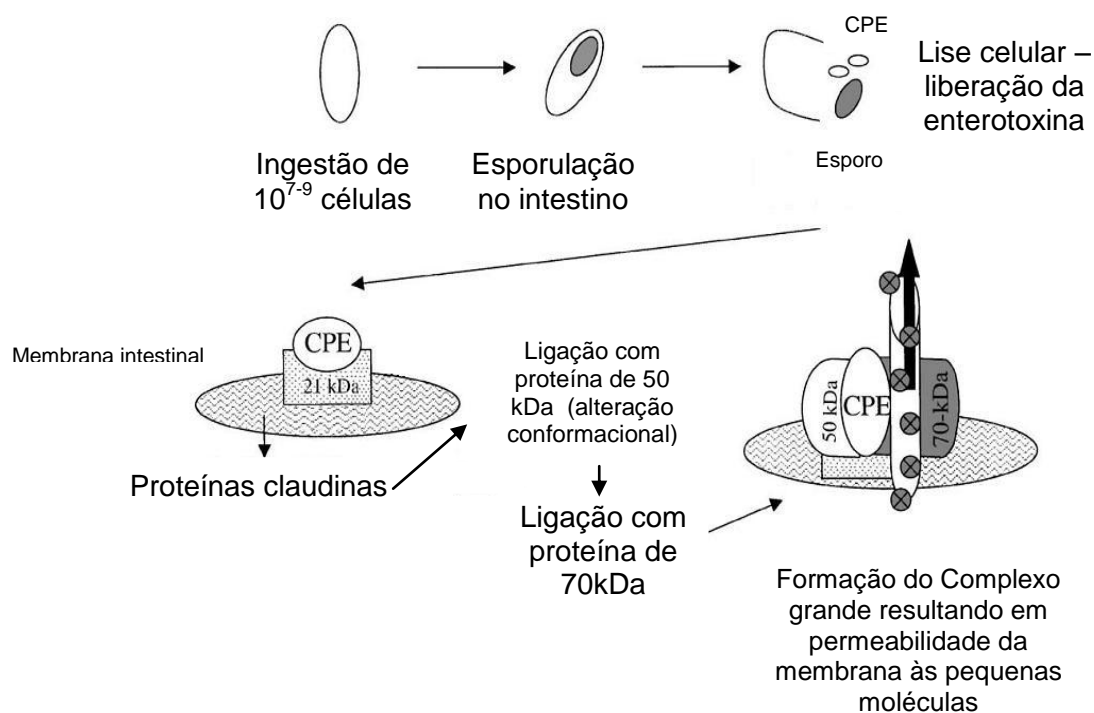


Figura 1. Diagrama esquemático mostrando as principais etapas envolvidas no mecanismo de intoxicação alimentar por *C. perfringens* (BRYNESTAD e GRANUM, 2002).

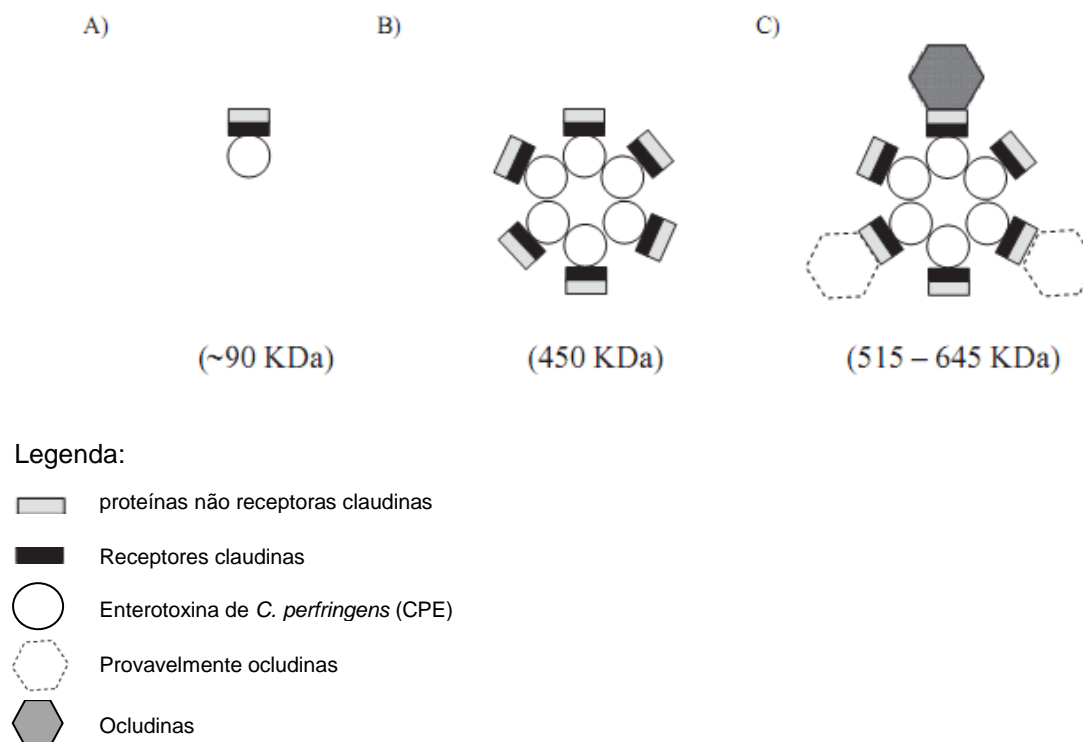


Figura 2. Modelo esquemático da configuração dos complexos pequenos e grandes formados pela CPE, segundo Robertson *et al.*, 2007. **A)** configuração esquemática do complexo pequeno; **B)** configuração esquemática do hexâmero CPE (“complexo grande de ~450 kDa”). **C)** configuração esquemática do hexâmero CPE (complexo grande de ~600 kDa).

A CPE é a responsável pelas toxi-infecções alimentares, por doenças gastrointestinais não veiculadas por alimentos em humanos, como por exemplo, a diarreia associada ao uso de antibióticos, e algumas doenças gastrointestinais em animais (McCLANE e CHAKRABARTI, 2004).

A enterotoxina de *C. perfringens* é codificada pelo gene *cpe*, que pode estar localizado tanto no DNA cromossomal quanto no DNA plasmidial, sendo que em ambas as localizações, o gene *cpe* pode está associado a elementos transponíveis. Dentre os genes codificadores de toxinas de *C. perfringens*, esse gene é o único que possui tal característica (SHIMIZU *et al.*, 2002).

Esse gene, quando localizado no DNA cromossomal, está associado a um elemento transponível de 6,3 kb, chamado de Tn5565, e apresenta uma seqüência de inserção (IS1470) *upstream* e uma *downstream* ao gene *cpe* (Figura 3) (BRYNESTAD *et al.*, 1997).

Com relação à organização molecular do *locus* do gene *cpe* plasmidial, pelo menos dois arranjos são observados (Figura 3). Algumas cepas de *C. perfringens* apresentam uma seqüência de inserção semelhante a IS1470, presente no DNA cromossomal. Esta seqüência, chamada de IS1470-Like, apresenta orientação inversa quando comparada com a IS1470. A outra organização molecular observada é a presença da seqüência de inserção IS1151. Ambas as seqüências de inserção, IS1470-Like ou IS1151, localizam-se *downstream* ao gene *cpe* plasmidial (Figura 3) (BRYNESTAD *et al.*, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 2002).

Métodos moleculares, como a PCR, permitem determinar a localização do gene *cpe* através da detecção destas seqüências de inserção (IS1470, IS1511 ou IS1470-Like) localizadas *downstream* ao gene *cpe* (MIYAMOTO *et al.*, 2004).

Em geral, as cepas isoladas a partir de toxi-infecções alimentares apresentam o gene *cpe* localizado no cromossomo, enquanto que em isolados associados às enfermidades não alimentares, sua localização é plasmidial (LI e McCLANE, 2006).

Os esporos e células vegetativas de *C. perfringens* tipo A contendo o gene *cpe* cromossômico, quando comparados aos de *C. perfringens* tipo A contendo o gene *cpe* plasmidial, apresentam maior resistência a temperaturas elevadas (55°C e 100°C) (SARKER *et al.*, 2000), baixas temperaturas (4°C e -20°C) e menor tempo de geração a 25°C, 37°C e 43°C (LI e McCLANE, 2006). Estes fatos podem explicar a maior freqüência de isolamento de *C. perfringens* portador do gene *cpe* cromossômico em surtos alimentares.

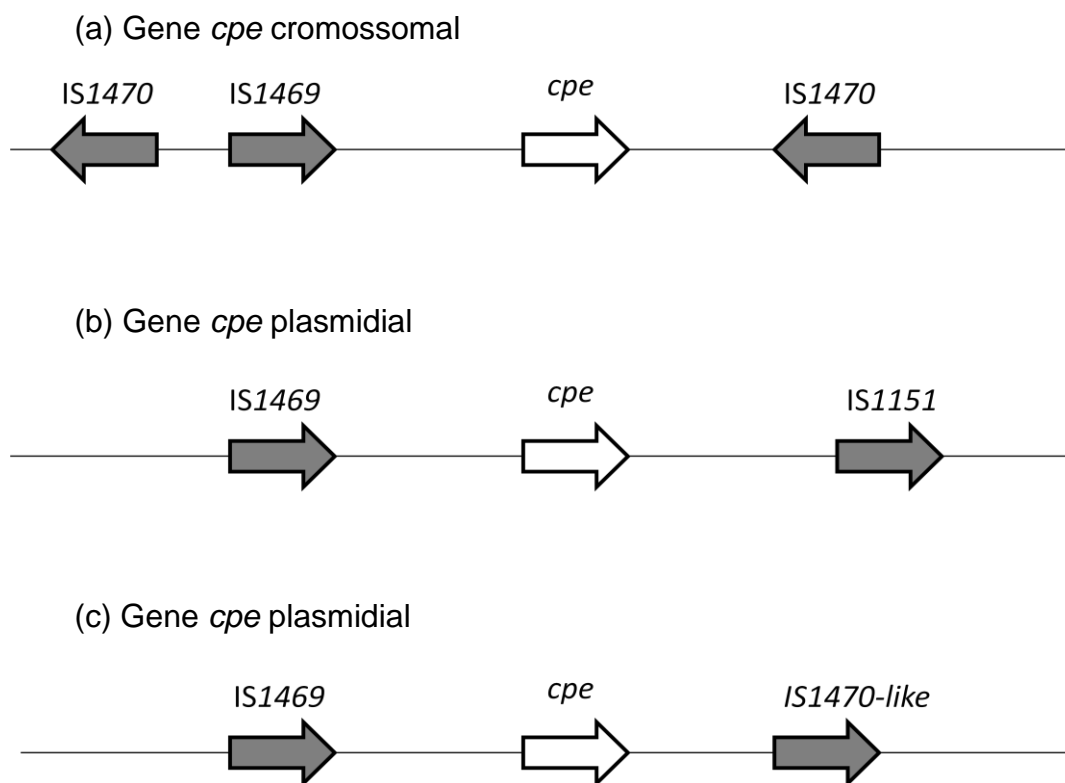


Figura 3. Localização de seqüências de inserção (IS) específicas em isolados de *Clostridium perfringens* tipo A em relação a localização do gene *cpe*. (a) IS1470 em cepas com *cpe* cromossomal, (b) seqüência IS1151 e (c) IS1470-Like em cepas com *cpe* plasmidial (MIYAMOTO *et al.*, 2004)

1.3. Doenças causadas por *C. perfringens*

Diversas doenças são associadas a *C. perfringens*, como a gangrena gasosa (ou mionecrose), diarreia associada ao uso de antibióticos (VAISHNAVI e KAUR, 2008) e toxi-infecção alimentar em humanos (HATHEWAY, 1990).

As toxi-infecções alimentares são divididas em toxi-infecção causada por *C. perfringens* tipo A, produtor de enterotoxina, e a enterite necrótica causada por *C. perfringens* tipo C (GRANUM, 1990).

1.3.1. Enterite necrótica

C. perfringens tipo C é o agente responsável pela enterite necrótica, sendo a toxina β responsável pelos sintomas. Essa doença é caracterizada por vômitos,

diarréias sanguinolentas e dores abdominais severas, seguidas de inflamação necrótica do intestino delgado. Apesar de extremamente severa, apresentando uma taxa de mortalidade entre 15% a 25%, mesmo com tratamento, esta doença é extremamente rara, não tendo sido relatada na Europa durante as últimas décadas (BRYNESTAD e GRANUM, 2002).

Fatores nutricionais e sociais são importantes na epidemiologia dessa doença. A enterite necrótica está associada a indivíduos com baixa produção de enzimas proteolíticas em seus intestinos, normalmente resultante da baixa ingestão de proteínas, e agravada pela ingestão de alimentos inibidores de tripsina, como a batata-doce. Como a β -toxina é rapidamente inativada no trato gastrointestinal pela tripsina, indivíduos que apresentam baixa quantidade desta enzima, tornam-se mais susceptíveis à doença (ROOD, 1998).

1.3.2. Toxi-infecção causada por *C. perfringens* tipo A

A toxi-infecção causada por *C. perfringens* tipo A ocorre após a ingestão de alimentos contendo populações elevadas ($>10^7$) de células vegetativas produtoras de enterotoxina (CPE). Ao atingir o intestino delgado o microorganismo esporula e produz a toxina, que é acumulada em seu citoplasma. Ao término da esporulação a toxina é liberada no intestino delgado, juntamente com o esporo, resultando na enfermidade (BRYNESTAD e GRANUM, 2002).

Esta enfermidade apresenta como sintomas característicos náuseas, dores abdominais agudas e diarreia, sendo que esses sintomas se iniciam entre seis e 24 horas após o consumo do alimento contaminado. Normalmente, essas toxi-infecções são auto-limitadas, apresentando duração de aproximadamente 24 horas (BRYNESTAD e GRANUM, 2002). Porém, em idosos e pacientes imunodeprimidos o quadro clínico pode ser mais severo.

1.4. Surtos de toxi-infecção alimentar causados por *C. perfringens*

Algumas características apresentadas pelo *C. perfringens*, como: curto tempo de geração (< 10 minutos para alguns isolados), formação de esporos resistentes a

diversas condições de estresse, como temperaturas elevadas, dessecação, irradiação, entre outros, o tornam um dos microorganismos mais freqüentemente envolvidos em surtos de ETA. Os alimentos contaminados foram, na maioria das vezes, tratados termicamente, o que leva à destruição da microbiota competidora e permite que os esporos de *C. perfringens* germinem e o microrganismo se torne a microbiota dominante (ANDERSSON *et al.*, 1995). Além disso, o tratamento térmico reduz o Eh dos alimentos, criando uma atmosfera ideal para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios.

A maioria dos surtos de toxi-infecção alimentar relatada é associada a estabelecimentos de refeições coletivas, como restaurantes, escolas e hospitais, onde a produção de alimentos é maior que a demanda diária. O alimento excedente, resfriado e/ou (re) aquecido de maneira inadequada, permite a multiplicação de *C. perfringens*, tornando o alimento um potencial risco biológico (BRYNESTAD e GRANUM, 2002; DE JONG *et al.*, 2004).

Os alimentos a base de carne, e ingredientes como os condimentos utilizados na preparação desses, são os principais veículos desse patógeno (KALINOWSKI *et al.*, 2003; WEN e McCLANE, 2004). Em alimentos que apresentam grande dimensão, como os grandes pedaços de carnes e carcaças de aves como o peru, é difícil atingir temperaturas internas elevadas o suficiente para inativar os esporos de *C. perfringens*. Além disso, estes alimentos após cozidos devem ser resfriados rapidamente ou servidos imediatamente, a fim de minimizar a multiplicação de *C. perfringens* (McCLANE, 2007).

Nos Estados Unidos, no período de 1998 a 2002, de acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) foram detectados e relatados 130 surtos e 6.724 casos de toxi-infecção alimentar causados por *C. perfringens* tipo A. Nesse período, *C. perfringens* foi o terceiro agente mais comum em surtos, e o segundo principal agente em número de casos (LYNCH *et al.*, 2006).

Os dados estatísticos referentes às doenças de origem alimentar ocorridas no ano de 2006, nos EUA, indicam uma diminuição no número de surtos e casos associados a *C. perfringens* tipo A, quando comparados com a média anual dos anos anteriores (MMWR, 2009). Entre 2001 e 2005 a média anual de surtos e casos por *C. perfringens* tipo A foi de 51 e 2.077, e em 2006, foi de 34 e 1.880, respectivamente. Apesar da redução no número de surto e casos, *C. perfringens*

continua sendo um dos principais agentes etiológicos envolvidos em toxi-infecções alimentares naquele país (MMWR, 2009).

Em 2006, nos Estados Unidos, *C. perfringens* foi relatado como agente responsável pelo maior número de casos de doenças de origem alimentar em produtos derivados de aves, com 902 casos, seguido por *Salmonella* em frutas e nozes (776 casos) e norovírus em vegetais folhosos (657 casos) (MMRW, 2009). Os maiores surtos de etiologia conhecida e associada a um único alimento também foram atribuídos ao *C. perfringens*, com 741 casos, sendo o veículo de transmissão o frango cozido (MMRW, 2009).

No Brasil, surtos envolvendo esse microorganismo foram relatados em diversos estados. No estado de São Paulo, entre 1998 e 2002, foram notificados à Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA), do Centro de Vigilância Epidemiológica, 1.047 surtos, sendo *C. perfringens*, juntamente com *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* responsáveis por 71 (6,8%) casos. Nesses surtos, a carne e os produtos cárneos foram os principais veículos de *C. perfringens* (SÃO PAULO, 2008).

No Estado do Paraná, no período de 1978 a 2000, *C. perfringens* foi o terceiro agente responsável por surtos de ETA causados por bactérias, sendo responsável por 122 de um total de 1.195 surtos. *Staphylococcus aureus* foi o principal agente responsável por surtos (492), seguido por *Salmonella* (404 surtos). Alimentos de origem animal foram os mais freqüentemente associados a esses surtos e os domicílios representaram o local de maior incidência dos mesmos. Os principais alimentos envolvidos foram frango, carne e produtos cárneos (AMSON *et al.*, 2006).

A simples detecção de *C. perfringens* em um alimento, mesmo naqueles suspeitos de causar surto, não é suficiente para considerá-lo como de risco à saúde do consumidor. Isto porque isolados de *C. perfringens* não produtores de CPE estão amplamente disseminados no ambiente, em alimentos ou mesmo em fezes de pessoas saudáveis (HEIKINHEIMO *et al.*, 2006). Dentre os isolados de *C. perfringens*, 5% ou menos, apresentam o gene *cpe* (McCLANE, 2007), ou seja, são capazes de causar doenças de origem alimentar.

Desta forma, caracterizar geneticamente esse microorganismo pode auxiliar na elucidação de surtos, e ainda fornecer informações importantes sobre as cepas circulantes em nosso meio.

Para a caracterização de *C. perfringens*, diversos métodos têm sido descritos e utilizados, tais como análise de plasmídeos, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), análise do perfil de macrorestrição por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), entre outros. Os métodos moleculares têm se mostrado como ferramentas úteis para investigações epidemiológicas de surtos e para o controle e monitoramento da disseminação de potenciais patógenos (SCHALCH *et al.*, 1999). Dentre os métodos moleculares, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) vem sendo bastante utilizada, sendo considerada “*gold standard*” para subtipificação, devido sua reprodutibilidade e alto poder de discriminação.

Apesar de todos os avanços nos métodos de pesquisa e detecção de patógenos que vem ocorrendo nas últimas décadas, em nosso país ainda se recomenda a enumeração de clostrídios sulfito redutores como indicador da presença de *C. perfringens* patogênico em alimentos (BRASIL, 2001). Esse critério pode levar à condenação desnecessária de grandes volumes de alimentos que apresentam baixo risco à saúde dos consumidores. Dados sobre a ocorrência e caracterização molecular de *C. perfringens* isolados de alimentos, animais ou de solo são raros em nosso país, o que justifica o presente estudo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a frequência de *C. perfringens* dentre os clostrídios sulfito redutores isolados de alimentos, solo e fezes de animais;
- Verificar a frequência dos tipos toxigênicos de *C. perfringens*;
- Verificar a presença e localização do gene codificador da enterotoxina CPE nos isolados de *C. perfringens*;
- Verificar o potencial toxigênico dos isolados de *C. perfringens*
- Avaliar a relação genética dos isolados de *C. perfringens*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Cepas padrão

A cepa de *C. perfringens* ATCC 13124 (Oxoid, Inglaterra) foi utilizada como controle positivo das reações bioquímicas. Como controles positivos para a reação de tipagem molecular foram utilizadas cepas de *C. perfringens* tipos A, B, C, D e E, e como controle positivo da detecção do gene *cpe* foi utilizada uma cepa de *C. perfringens* reconhecidamente *cpe*-positiva. Essas cepas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

Salmonella Braenderup (cepa H9812) foi utilizada como marcador de peso molecular para a realização da eletroforese em campo de gel pulsado (PFGE).

3.1.2. Obtenção dos isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de alimentos

Foram analisados 126 isolados, dos quais 100 eram provenientes de amostras submetidas a análises rotineiras de avaliação de qualidade e 26 provenientes de amostras suspeitas de causarem toxi-infecção alimentar.

Os isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de alimentos foram fornecidos por diferentes laboratórios de empresas produtoras de alimentos e de prestação de serviços, localizados tanto no Estado de São Paulo, como fora dele. Todos os isolados foram mantidos congelados a -70°C, em caldo tioglicolato (Difco, França) adicionado de 20% (v/v) de glicerol, até o momento de uso.

3.1.3. Obtenção dos isolados de clostrídios sulfito redutores de solo

Foram coletadas 10 amostras de solo de regiões próximas a restaurantes localizados na zona Oeste da cidade de São Paulo.

Para obtenção das amostras de solo, removeu-se a camada superior do local, com o auxílio de uma luva esterilizada. Após remoção da superfície foram coletados aproximadamente 50 g de solo com auxílio de uma colher esterilizada. As amostras foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis e analisadas em até uma hora após a coleta.

3.1.4. Obtenção de isolados de clostrídios sulfito redutores de fezes de animais

Foram coletadas 15 amostras de fezes de animais, sendo nove de bovinos e seis de ovinos, todas as amostras provenientes da zona Oeste da cidade de São Paulo.

As amostras de fezes foram obtidas através de coleta retal com o auxílio de luvas esterilizadas. Cada amostra foi composta de aproximadamente 50 g de fezes, sendo as mesmas analisadas em até uma hora após a coleta.

3.2. Métodos

3.2.1. Verificação da pureza dos isolados de clostrídios sulfito redutores de alimentos

Um mililitro da cultura armazenada a -70°C foi inoculado em 10 mL de caldo tioglicolato e incubado em anaerobiose a 37°C por 18-24 horas, utilizando o sistema gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac, Brasil) em jarras de anaerobiose de 2,5L (Merck, Alemanha). A seguir, este caldo foi semeado superficialmente em ágar Sahid Ferguson perfringens (Difco) adicionado de 0,04% de D-cicloserina (Sigma, EUA) (TSC) e recoberto com uma sobrecamada do mesmo meio para facilitar a visualização das colônias características, sendo então incubado em anaerobiose a 46°C por 24 horas. Uma colônia característica, ou seja, enegrecida pela produção de H_2S , foi selecionada e submetida à confirmação morfológica por coloração de Gram. Todos os cultivos que se apresentaram como bastonetes Gram positivos foram definidos como pertencentes ao grupo clostrídio sulfito redutor e mantidos

congelados a -70°C em caldo tioglicolato (Difco), adicionado de 20% (v/v) de glicerol esterilizado, até o momento de uso.

3.2.2. Isolamento de clostrídios sulfito redutores de amostras de solo

Uma alíquota de um grama de solo foi homogeneizada em nove mililitros de solução salina 0,85% (p/v). A seguir foi semeada superficialmente em ágar TSC e recoberta com sobrecamada do mesmo meio. Após incubação em anaerobiose a 46°C por 24 horas, foram selecionadas 10 colônias enegrecidas de cada amostra, totalizando 100 isolados, que foram submetidos à confirmação morfológica por coloração de Gram. Os isolados bacterianos característicos foram mantidos até o momento da utilização conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.3. Isolamento de clostrídios sulfito redutores de amostras de fezes de animais

De cada uma das 15 amostras de fezes, foram retiradas duas alíquotas de um grama cada. Ambas as alíquotas foram inoculadas em 10 mL de caldo de carne cozida (Oxoid, Inglaterra), sendo que uma delas foi tratada termicamente a 75°C por 20 minutos, seguida por choque térmico em gelo antes da incubação, com o objetivo de estimular a germinação de esporos, enquanto a outra foi incubada diretamente. Ambos os meios foram incubados em anaerobiose a 37°C por 24 horas. Em seguida, os caldos foram semeados superficialmente em ágar TSC e recobertos com sobrecamada do mesmo meio e foram tratadas conforme descrito em 3.2.1.. Foram selecionadas cinco colônias características de cada placa que foram então submetidas à confirmação morfológica por coloração de Gram.

Os isolados de clostrídios sulfito redutores foram conservados a -70°C , conforme anteriormente apresentado, até o momento de uso.

3.2.4. Identificação bioquímica de *C. perfringens*

Os isolados caracterizados como clostrídios sulfito redutores foram submetidos à identificação bioquímica, segundo Rhodehamel e Harmon (2001).

Um mililitro do cultivo armazenado à -70°C foi inoculado em caldo tioglicolato regenerado e incubado em anaerobiose a 35°C por 24 horas. Esse cultivo foi utilizado na identificação bioquímica das amostras descrita a seguir.

3.2.4.1. Teste de fermentação tempestuosa em meio leite com ferro

Um mililitro do caldo tioglicolato (3.2.4.) foi inoculado em 11 mL do meio leite com ferro e em seguida foi adicionada uma camada de vaselina líquida esterilizada sendo então incubado a 46°C por 6h em banho-maria.

3.2.4.2. Testes de motilidade e redução do nitrato

A cultura de 24 h, proveniente do caldo tioglicolato (3.2.4.), foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de ágar motilidade-nitrato (anexo 1) com o auxílio de uma agulha bacteriológica, e o tubo foi incubado em anaerobiose a 36°C por 24 h. A visualização de multiplicação bacteriana apenas ao longo da linha de inoculação, indica a ausência de motilidade e a turvação completa do meio indica a presença de motilidade.

Após a leitura da prova da motilidade, foram adicionados ao meio 0,5 mL de reagente A (anexo 2) e 0,2 mL de reagente B (anexo 3), para realização do teste de redução do nitrato. A alteração na coloração do meio de incolor para vermelho, em um período máximo de cinco minutos, indica a redução de nitrato a nitrito. Na ausência de coloração foi adicionada uma pitada de pó de zinco ao meio. A alteração na coloração de incolor para vermelho indica a presença de nitrato e conseqüentemente a ausência de sua redução. Já a ausência de alteração da coloração indica ausência de nitrato e conseqüentemente sua total redução a nitrito.

3.2.4.3. Testes de fermentação de lactose e liquefação de gelatina

A cultura em caldo tioglicolato (3.2.4.) foi inoculada com uma agulha bacteriológica em diversos pontos de um tubo de ensaio contendo 10 mL de ágar lactose gelatina (anexo 4). O meio foi incubado em anaerobiose a 35°C por 44h. Após o período de incubação foi verificada a alteração na coloração do meio de vermelho para amarelo, indicando fermentação da lactose, e a liquefação da gelatina, verificada pela permanência do estado líquido após incubação a 4°C por 1h.

3.2.4.4. Interpretação dos resultados bioquímicos

Os isolados bacterianos que fermentaram tempestuosamente o meio leite com ferro, fermentaram lactose, hidrolisaram a gelatina, apresentaram redução do nitrato a nitrito e não apresentaram motilidade foram caracterizados bioquimicamente como *C. perfringens*.

Os isolados identificados como *C. perfringens* foram selecionados e mantidos a -70°C em caldo tioglicolato com 20% (v/v) glicerol para posterior utilização.

3.2.5. Identificação dos tipos toxigênicos de *C. perfringens* e detecção da presença do gene *cpe*

3.2.5.1. Extração e quantificação do DNA total

Todos os isolados identificados como *C. perfringens*, obtidos conforme item 3.2.4.4. foram semeados em 10 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) e incubados em anaerobiose a 37°C, por 18-24 horas. Uma alíquota de 1 mL desse caldo foi utilizada para realizar a extração do DNA total, utilizando o Kit QIAamp DNA (Qiagen, EUA), segundo instruções do fabricante descritas a seguir.

A alíquota foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 x *g* [centrífuga 5417C (Eppendorf, Alemanha)]. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado ressuspendido com 180 µL de solução composta por lisozima (20 mg.mL⁻¹), Tris-HCl (20mM, pH 8,0), EDTA (2mM) e Triton [1,2%(v/v)] e incubado a 37°C por 1 hora. A seguir a amostra foi incubada a 56°C por 30 minutos (Multi Temp III – Pharmacia

Biotech, EUA), seguida de incubação a 95°C por 15 minutos (AccuBlock – Digital Dry Bath, Labnet, EUA). Adicionou-se 200 µL de tampão AL (Qiagen) e a amostra foi incubada a 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200 µL de etanol P.A. (98%) e o produto foi aplicado nas colunas de extração. O DNA foi lavado com os tampões AW1 e AW2 (Qiagen) e eluído em tampão AE (Qiagen).

Foi realizada a quantificação da concentração do DNA por espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o equipamento Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, EUA), segundo Sambrook *et al.* (1989). O produto da extração foi diluído com tampão de eluição (Qiagen), a fim de obter uma concentração final de 100 ng de DNA/µL, e foi mantido a -20°C até o momento do uso.

3.2.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese (BAUMS *et al.*, 2004, modificado)

A multiplex PCR para genotipagem de *C. perfringens* foi realizada em volume total de 25 µL de mistura de reação composta por 200 nM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen) (Tabela 1), 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas, Canadá), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1x tampão *Taq* (com KCl) (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas) e 1 µL de DNA molde a ser testado (3.2.5.1.). Em todas as reações foram utilizadas as cepas *C. perfringens* tipo A, B, C, D e E como controles positivos, e como controle negativo utilizou-se água ultra pura esterilizada em substituição ao DNA molde.

Para a detecção do gene *cpe* foi realizada uma PCR simples. Para tanto, empregou-se um volume total de 25 µL da mesma mistura de reação anteriormente descrita, mas utilizando 200 nM dos oligonucleotídeos F - GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA e R - ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG (BAUMS *et al.*, 2004). Um fragmento de 506 pb foi considerado como resultado positivo para a presença do gene *cpe*.

A reação de amplificação foi realizada pelo aquecimento inicial a 94°C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, pareamento a 53°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, e por último, uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Esta reação foi realizada em termociclador epMastercycler S (Eppendorf, EUA). O produto da amplificação foi mantido a 4°C até o momento da avaliação por eletroforese.

Alíquotas de 5 µL do produto final da reação foram homogeneizadas com 1 µL de *loading buffer* (Fermentas) e submetidas à eletroforese por 30 minutos a 100V em gel de agarose 1,0% (Pharmacia, EUA) submerso em tampão TBE 0,5X (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA; pH 8,0) (SAMBROOK *et al.*, 1989). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 µg.L⁻¹) (Pharmacia) por 20 minutos, visualizado e fotografado sob transiluminação UV, utilizando o sistema EDAS120 (Eastman Kodak, EUA). O marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Fermentas) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos, utilizados na reação multiplex PCR para tipagem do *C. perfringens*, segundo Baums *et al.* (2004).

Genes	Tamanho do produto (pb)	Seqüência do oligonucleotídeo (5´-3´)	Toxina
<i>cpa</i>	900	F – AGTCTACGCTTGGGATGGAA R – TTCCTGGGTTGTCCATTTTC	α
<i>cpb</i>	611	F – TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA R – TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	β
<i>etx</i>	396	F – TGGGAACTTCGATACAAGCA R – TTAACCTCATCTCCCATAACTGCAC	ε
<i>iap</i>	293	F – AAACGCATTAAAGCTCACACC R – CTGCATAACCTGGAATGGCT	I

F – Sentido R - Reverso

3.2.5.3. Determinação da localização do gene *cpe* em cepas de *C. perfringens* tipo A (MIYAMOTO *et al.*, 2004)

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras de DNA extraídas conforme item 3.2.5.1.

Utilizou-se multiplex PCR para determinar a localização do gene *cpe* nas cepas. Um volume total de 25 µL de mistura de reação composta por 300 nM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen) (Tabela 2), 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas),

1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1x tampão *Taq* (com KCl) (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas) e 1 µL de DNA molde a ser avaliado (item 3.2.5.1.).

A amplificação foi realizada pelo aquecimento inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 68°C por 1,5 minutos e uma extensão final de 8 minutos a 68°C. Esta reação também foi realizada em termociclador epMastercycler S e o produto da amplificação foi mantido a 4°C até o momento da avaliação por eletroforese.

O produto final da reação foi avaliado por eletroforese como descrito no item 3.2.5.2. O marcador de peso molecular 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação multiplex PCR para determinação da localização do gene *cpe* em cepas de *C. perfringens*, segundo Miyamoto *et al.* (2004).

Produto amplificado	Localização do gene <i>cpe</i>	Seqüência do oligonucleotídeo (5´-3´)	Tamanho do produto
<i>cpe</i> – IS1470-Like	Plasmidial	F – TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG R – CTTTGTGTACACAGCTTCGCCAATGTC	1,6 kb
<i>cpe</i> - IS1151	Plasmidial	F – TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG R - ATCAA AATATGTTCTTAAAGTACGTTTC	0,8 kb
<i>cpe</i> – IS1470	Cromossomal	F – TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG R – CTTCTTGATTACAAGACTCCAGAAGAG	1,3 kb
<i>cpe</i>	-	F – GATAAAGGAGATGGTTGGATATTAGG R – GAGTCCAAGGGTATGAGTTAGAAG	0,6 kb

F – Sentido R - Reverso

3.2.6. Avaliação da relação genética dos isolados de *C. perfringens*

Essa avaliação foi realizada com auxílio da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de acordo com o protocolo cedido por MALASKA (2008, comunicação pessoal, modificado).

Como marcador de peso molecular foi utilizada o DNA da cepa de *Salmonella* sorotipo Braenderup H9812, restringida com a enzima XbaI, utilizando o protocolo preconizado pelo PulseNet, CDC (Center for Disease Control and Prevention, EUA), segundo Hunter *et al.* (2005).

3.2.6.1. Suspensão celular e preparo dos blocos de agarose

As cepas de *C. perfringens* foram semeadas em ágar TSC e incubadas por 24 h a 46°C em anaerobiose. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de caldo BHI e incubada por 24 h a 37°C em anaerobiose. Uma alíquota de 1,3 mL do caldo BHI foi transferida para microtubos e centrifugada a 5.000 x g [centrífuga 5417C (Eppendorf)] por 10 minutos. O material sobrenadante foi desprezado e a massa celular pesada. Para cada micrograma da massa celular foram adicionados 100 µL de tampão de suspensão celular (CSB) [100 mM Tris-HCl (Pharmacia); 100 mM EDTA, pH 8,0] e a mistura foi homogeneizada.

A cepa de *Salmonella* Braenderup foi semeada por superfície em ágar triptona de soja (TSA) (Difco, França) e incubada a 37°C por 14-18 horas. Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, três a cinco colônias foram transferidas para 3 mL de CSB e a densidade óptica corrigida para 1,3 – 1,4 a uma absorvância de 610 nm (Ultrospec 2000 – Pharmacia).

Para uma alíquota de 500 µL da suspensão celular, tanto de *C. perfringens* como de *Salmonella* Braenderup, foram adicionados 25 µL de solução de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) (Sigma, EUA) e 500 µL de solução 1% (p/v) de Seakem Gold Agarose (Cambrex, EUA) adicionada de 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (USB, EUA). Após a homogeneização, aproximadamente 300 µL da mistura foram distribuídos nos moldes (BioRad, EUA) que foram mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para solidificação.

3.2.6.2. Lise celular e lavagens

Os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon, com capacidade para 50 mL, contendo 5 mL de solução de lise [50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8,0 + 1% Sarcosina (Sigma)] à qual foram adicionados 25 μL de solução de proteinase K (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os tubos foram incubados sob agitação constante de 200 rpm (agitador Shaker Innova 4000, New Brunswick Scientific) por 4 horas a 54°C. Em seguida, os blocos foram submetidos a duas lavagens com água Milli-Q esterilizada pré-aquecida a 50°C, seguida por quatro lavagens com tampão TE esterilizado pré-aquecido a 50°C. Todas as lavagens foram realizadas a 50°C, com pelo menos 10 mL da solução de lavagem, sob agitação constante a 200 rpm. Os blocos de agarose foram armazenados em tubos Eppendorf com um mililitro de tampão TE, sob refrigeração (3 a 8°C), até o momento de uso.

3.2.6.3. Restrição enzimática

Para a realização da restrição enzimática foram utilizados fragmentos dos blocos de agarose de aproximadamente 2-3 milímetros. Dois fragmentos de cada bloco foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos com 200 μL de tampão 1 X (Fermentas). O tampão foi substituído por 200 μL da solução de restrição [1X Buffer Tango; 40 U SmaI (Fermentas)], para as cepas de *C. perfringens* e por 200 μL da solução de restrição [1X Buffer Tango; 40 U XbaI (Fermentas)], para a cepa de *Salmonella* Braenderup. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados a 25°C por 4 h.

3.2.6.4. Eletroforese em campo pulsado

Os produtos da digestão enzimática foram separados através de eletroforese em gel de agarose (1% Seakem Gold Agarose) em tampão TBE 0,5X com 50 μM de tiouréia empregando-se o sistema CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad, EUA). Os parâmetros utilizados foram: tempo inicial = 0,5 segundos, tempo final = 40,0

segundos, tempo de corrida = 17 h, voltagem = 200 v, temperatura do tampão = 14°C. Após a eletroforese, o gel foi corado e fotografado conforme o item 3.2.5.2.

3.2.6.5. Análise dos resultados

Os padrões de bandas gerados foram comparados visualmente e agrupados em perfis. Para determinar a correlação entre os perfis foi utilizado o programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica) utilizando-se o coeficiente de Dice (DICE, 1945) e análise de clusters UPGMA (Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average) (SNEATH e SOKAL, 1973), com valor de tolerância de 1.4% e otimização 0,5%.

3.2.7. Detecção de enterotoxina

Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit de detecção de toxinas PET-RPLA (Oxoid, EUA), conforme instruções do fabricante detalhadas a seguir.

3.2.7.1 Obtenção de enterotoxina

As cepas de *C. perfringens* foram cultivadas em meio de carne cozida incubado em anaerobiose a 37°C por 20 horas. Este cultivo foi então aquecido por 20 minutos a 75°C e 0,8 mL foram transferidos para 16 mL do meio Duncan-Strong modificado (anexo 5) que foi incubado por 24 h a 37°C. Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 9.000 x *g* (centrífuga 5417C) durante 20 minutos e o sobrenadante obtido utilizado para realização do ensaio.

3.2.7.2. Avaliação da presença de enterotoxina

Os testes para detecção de enterotoxina foram realizados em placas de microtitulação contendo 12 fileiras com oito poços com fundo em “V”. Foram adicionados 25 µL de solução salina fosfatada tamponada contendo albumina de

soro bovino (Oxoid) em cada poço de duas fileiras, exceto no primeiro poço de cada fileira. Em seguida foram adicionados 25 µL da amostra (preparadas conforme 3.2.7.1) nos dois primeiros poços das duas fileiras. Foram realizadas diluições seriadas a partir do segundo poço, com agitação e transferência de 25 µL para o poço seguinte até o penúltimo poço da fileira. Terminadas as diluições, foram adicionados 25 µL de látex sensibilizado a cada poço da primeira fileira e 25 µL de controle de látex a cada poço da segunda fileira. As leituras foram realizadas após 20-24 horas de incubação da placa a temperatura ambiente.

3.2.7.3. Interpretação dos resultados

Os poços contendo o controle de látex juntamente com a amostra foram considerados como controle da reação. Nestes poços, a aglutinação não deve ser observada. A aglutinação é verificada nos poços contendo a amostra e o látex sensibilizado, indicando a presença de CPE. O poço contendo apenas a solução salina fosfatada e o látex sensibilizado deve ser utilizado como controle negativo da reação, sendo que nesse poço, a presença de aglutinação não deve ser observada.

Segundo o fabricante, aglutinações não específicas podem ser observadas. Nesses casos, a amostra testada reagirá com o látex sensibilizado a uma diluição menor que a que foi observada com o controle de látex, sendo o resultado considerado negativo. Em casos onde não são observadas aglutinações não específicas, os resultados são avaliados em comparação com a ilustração fornecida no manual do fabricante (Figura 4). Os resultados classificados como (+), (++) e (+++) são considerados como positivos.

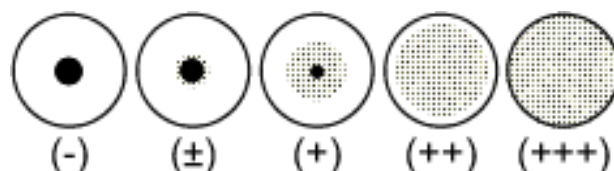


Figura 4. Ilustração dos perfis de aglutinação possíveis de serem observados com o kit PET RPLA (Oxoid).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação bioquímica de *C. perfringens* em isolados provenientes de amostras de alimentos

Do total de 126 isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de alimentos 75 (59,5%) foram caracterizados como *C. perfringens*. Dentre as amostras submetidas às análises de avaliação de qualidade, 49 dos 100 isolados foram identificados como *C. perfringens* e dentre os isolados provenientes de amostras suspeitas de causarem toxi-infecção, a porcentagem de *C. perfringens* dentre os sulfito redutores foi de 100%, como se pode observar na Tabela 3.

Tabela 3. Isolados de clostrídios sulfito redutores e frequência de *Clostridium perfringens* em alimentos submetidos às análises para avaliação da qualidade e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.

Amostras	nº de isolados de Clostrídios sulfito redutores	nº de isolados de <i>Clostridium perfringens</i> (%)
Alimentos submetidos às análises rotineiras	100	49 (49,0)
Alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção	26	26 (100)
Total	126	75 (59,5)

A relação das amostras de alimentos, identificação e o número de isolados de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* podem ser encontrados na Tabela 4.

Tabela 4. Relação das amostras de alimentos, identificação e número de isolados de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* em alimentos submetidos às análises rotineiras e em alimentos suspeitos de causarem toxi-infecções alimentares.

Amostra	Identificação dos isolados	nº de isolados de clostrídios sulfito redutores	nº de isolados de <i>C. perfringens</i>
Envoltório natural salgado	001 a 005	5	0
Croquete de bacalhau cozido	6	1	0
Carne moída crua	007 a 011	5	5
Manjuba crua	012 a 016	5	0
Carne moída crua	017 a 021	5	5
Carne moída crua	022 a 026	5	5
Carne moída crua	027 a 029	3	3
Carne moída crua	030 a 034	5	5
Carne moída crua	035 a 039	5	5
Lombo assado	040 a 044	5	3
Lingüiça toscana crua	045 a 049	5	0
Carne temperada crua	50	1	0
Salsicha branca crua	051 a 055	5	0
Envoltório natural salgado	056 a 060	5	0
Salsicha crua	061 a 065	5	0
Lingüiça de frango crua	066 a 070	5	5
Feijão cozido*	071 a 072	2	2
Creme de milho cozido*	073 a 077	5	5
Carne assada – cupim*	078 a 082	5	5
Frango ao molho cozido*	083 a 084	2	2
Cupim assado*	085 a 086	2	2
Jardineira de carne cozida*	087 a 091	5	5
Filé de frango com milho*	092 a 096	5	5
CMS de aves	097 a 098	2	2
Salsichão bovino	99	1	1
Costela bovina assada	100	1	1
Farinha de trigo	101	1	0
Caldo de carne	102	1	0
Feijoada	103	1	0
Salpicão	104	1	0
Farinha de trigo	105	1	0
Frango assado	106	1	0
Farinha de trigo	107	1	0
Carne de panela	108	1	0
Farinha de trigo	109	1	1
Farinha de trigo	110	1	0
Farinha de trigo	111	1	1
Atum cru	112	1	0
Cubo churrasco	113	1	0
Carne crua extra light	114 a 115	2	0
Carne crua light	116 a 117	2	2
Farinha para bolo	118 a 119	2	0
Farfale de salmão	120 a 121	2	0
Carne suína crua	122 a 126	5	5
Total		126	75

* alimentos suspeitos de causar toxi-infecção alimentar.

De acordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2001), que regulamenta padrões microbiológicos para alimentos no comércio, a determinação de clostrídios sulfito redutor a 46°C tem por objetivo a indicação de *C. perfringens*. Entretanto, como observado nesse trabalho, apenas 49% dos clostrídios sulfito redutores analisados provenientes de alimentos não relacionados a surtos foram confirmados pelos métodos bioquímicos como sendo *C. perfringens*, indicando que a determinação de clostrídios sulfito redutores a 46°C não se apresenta como bom indicador para a presença de *C. perfringens*.

Dados da literatura sobre a frequência de *C. perfringens* dentre os isolados de clostrídios sulfito redutores tanto no Brasil como em outros países, não foram encontrados, não sendo assim possível utilizá-los para comparação.

4.2. Identificação bioquímica de *C. perfringens* em isolados provenientes de amostras de solo

Do total de 100 isolados de clostrídios sulfito redutores provenientes de solo, 16 perderam viabilidade não sendo possível utilizá-los. Dentre os 84 isolados restantes, 43 (51,2%) foram identificados bioquimicamente como *C. perfringens*.

A relação das amostras de solo, identificação e o número de isolados de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* pode ser observada na Tabela 5.

Em todas as 10 amostras de solo se verificou a presença de *C. perfringens*. A elevada frequência desse microrganismo encontrada nas amostras de solo pesquisadas concorda com àquelas já relatadas (HANG´OMBE *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2002).

Hang´ombe *et al.* (2000) analisaram solos de cinco regiões de Zambia e verificaram que *C. perfringens* estava presente em 80% destas. Segundo os autores foi observado que *C. perfringens* foi a espécie predominante, sendo identificada em 14 dos 107 (13,1%) isolados analisados.

Rodríguez *et al.* (2002), na Costa Rica, analisaram 33 amostras de solo de áreas próximas a abatedouros e verificaram a presença de *C. perfringens* em 88% (29/33) dessas amostras.

Tabela 5. Relação dos isolados de clostrídios sulfito redutores e freqüência de *Clostridium perfringens* provenientes de amostras de solo.

Amostra de solo	Identificação dos isolados	nº de isolados de clostrídios sulfito redutores	nº de isolados de <i>Clostridium perfringens</i> (%)
1	s1 – s7	7	4 (57,1)
2	s8 – s15	8	8 (100)
3	s16 – s25	10	4 (40)
4	s26 – s33	8	1 (12,5)
5	s34 – s40	7	2 (28,6)
6	s41 – s50	10	6 (60)
7	s51 – s58	8	4 (50)
8	s59 – s68	10	6 (60)
9	s69 – s77	9	6 (66,7)
10	s78 – s84	7	2 (28,6)
TOTAL		84	43 (51,2)

Gamboa *et al.* (2005), na Costa Rica, analisaram 1.945 isolados de clostrídios, provenientes de 117 amostras de solo. Dentre o grupo de clostrídios toxigênicos, *C. perfringens* e *C. sordelli* foram as espécies mais freqüentemente encontradas, estando presentes em 38% e 42% dos solos analisados, respectivamente. Ainda de acordo com esses pesquisadores a baixa ocorrência de *C. perfringens* encontrada, quando comparados com os resultados relatados por Rodríguez *et al.*, (2002), pode ser explicada pelas diferenças na metodologia empregada.

Li *et al.* (2007), nos Estados Unidos, analisaram 502 amostras de solo, e verificaram que 70% dessas amostras apresentaram *C. perfringens*.

A presença de *C. perfringens* em todas as amostras de solo analisadas nesse estudo reforça os achados que indicam que esse microrganismo está amplamente distribuído no solo, podendo esse ser uma das principais fontes de contaminação de alimentos. O alimento pode ser contaminado no local de produção ou processamento, por contato direto com o solo ou poeira contendo *C. perfringens* (LI *et al.*, 2007).

Assim como em alimentos, dados da literatura sobre a freqüência de *C. perfringens* dentre os isolados de clostrídios sulfito redutores, em solo, tanto no

Brasil como em outros países, não foram encontrados, não sendo assim possível a comparação dos dados.

4.3. Identificação bioquímica de *C. perfringens* em isolados provenientes de amostras de fezes de animais

A relação das amostras de fezes de animais, identificação e o número de isolados de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* podem ser observadas na Tabela 6.

Do total de 125 isolados bacterianos provenientes de fezes de animais, 55 foram obtidos de ovinos e 70 de bovinos. Destes, 28 (22,4%) foram identificados bioquimicamente como *C. perfringens*, sendo sete provenientes de ovinos e 21 de bovinos (Tabela 6).

A porcentagem de isolados de *C. perfringens* (22,4%) identificados a partir dos clostrídios sulfito redutores provenientes de fezes foi ainda menor que a observada para as demais amostras (59,5% para alimentos e 51,2% para solo). Como já apresentado, não existem dados na literatura sobre essa relação.

Dentre as seis amostras de fezes de ovinos analisadas, em apenas duas (33,3%) (amostras 1 e 5) foi detectada a presença de *C. perfringens* (Tabela 6). Nas amostras de fezes de bovinos a presença deste microrganismo foi maior, sendo encontrada em seis dos nove animais analisados (66,6%).

Nas amostras de fezes 6, 12, 13, 14 e 15 (Tabela 6) que foram inoculadas em caldo de carne cozida e que foram submetidas ao tratamento térmico não foi observada a presença de clostrídios sulfito redutores. Naquelas amostras onde houve multiplicação de clostrídios sulfito redutores a partir do caldo termicamente tratado, não se identificou *C. perfringens*.

Tabela 6. Relação dos isolados de clostrídios sulfito redutores e frequência de *Clostridium perfringens* provenientes de fezes de ovinos e bovinos.

Amostra de fezes	Identificação do isolado	Animal	nº de isolados de clostrídios sulfito redutores	nº de isolados de <i>C. perfringens</i> (%)
1	A1 - A10	Ovino	10	5 (50)
2	A11 - A20	Ovino	10	0 (-)
3	A21 - A30	Ovino	10	0 (-)
4	A31 - A40	Ovino	10	0 (-)
5	A41 - A50	Ovino	10	2 (20)
6	A51 - A55	Ovino	5	0 (-)
7	A56 - A65	Bovino	10	3 (30)
8	A66 - A75	Bovino	10	0 (-)
9	A76 - A85	Bovino	10	1 (10)
10	A86 - A95	Bovino	10	5 (50)
11	A96 - A105	Bovino	10	2 (20)
12	A106 - A110	Bovino	5	5 (100)
13	A111 - A115	Bovino	5	0 (-)
14	A116 - A120	Bovino	5	5 (100)
15	A121 - A125	Bovino	5	0 (-)
Total			125	28 (22,4%)

A frequência de isolamento de *C. perfringens* em fezes de ovinos se mostrou inferior ao relatado por outros pesquisadores. Aschfalk *et al.* (2002), no Oeste da África, analisaram 98 amostras de fezes de ovinos e verificaram que 71% delas apresentaram *C. perfringens*. Já Kalender *et al.* (2005), na Turquia, analisaram 194 intestinos de ovinos clinicamente sadios e verificaram a presença do microrganismo em 61 (31,4%) animais.

Três hipóteses podem ser levantadas para explicar a diferença encontrada na frequência de isolamento de *C. perfringens* em amostras de fezes de ovinos. A primeira é decorrente do pequeno universo amostral do presente estudo; a segunda está relacionada a diferenças geográficas na distribuição de *C. perfringens* e na sua ecologia; e por fim, diferenças nas metodologias utilizadas.

Para fezes de bovinos se observou que os dados do presente estudo são semelhantes aos de Gurjar *et al.* (2008) que, nos EUA, encontraram *C. perfringens* em 241 (78,5%) das 307 amostras examinadas.

4.4. Identificação dos tipos toxigênicos de *C. perfringens* e detecção da presença do gene *cpe*

Todos os 146 isolados identificados bioquimicamente como *C. perfringens* foram submetidos à PCR multiplex, para serem avaliados quanto à presença dos genes *cpa*, *cpb*, *etx* e *iap* (BAUMS *et al.*, 2004). Todos os isolados avaliados apresentaram amplificação do gene *cpa*, espécie-específico, confirmando os resultados bioquímicos observados. Como nenhum dos isolados identificados como *C. perfringens* apresentou amplificação dos genes *cpb*, *etx* e *iap*, estes foram então caracterizados como *C. perfringens* tipo A (HATHEWAY, 1990; ROOD, 1998).

As cepas de *C. perfringens* utilizadas como controles positivos para esta reação apresentaram os resultados esperados (Figura 5) indicando que caso os genes *cpb*, *etx* e *iap* estivessem presentes estes seriam detectados.

Em 20 (26,7%) das 75 cepas de *C. perfringens* tipo A provenientes de alimentos se observou a amplificação do gene *cpe* (Figura 6), sendo 19 provenientes de alimentos suspeitos de causarem surtos e apenas uma proveniente de alimento submetido à análise rotineira (Tabela 7).

Por outro lado, tanto os isolados de *C. perfringens* tipo A provenientes de solo, quanto os provenientes de amostras de fezes de animais não apresentaram amplificação deste gene, indicando não possuírem potencial para causar toxinfecção alimentar.

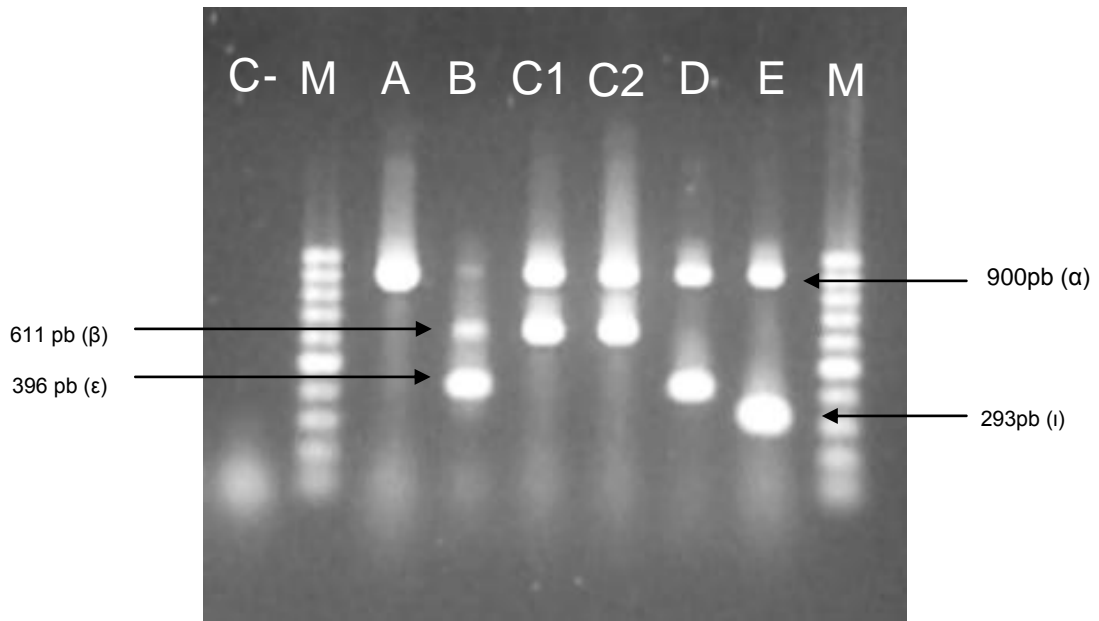


Figura 5. Tipagem de *C. perfringens* empregando-se Multiplex PCR, segundo Baums *et al.* (2004) com modificações. **C-**: controle negativo; **M**: marcador de peso molecular (100 pb); **A**: *C. perfringens* tipo A; **B**: *C. perfringens* tipo B; **C1 e C2**: *C. perfringens* tipo C; **D**: *C. perfringens* tipo D; **E**: *C. perfringens* tipo E. Junto ao peso molecular da banda está identificado o tipo de toxina codificado pelo gene.

Tabela 7. Total de isolados de *Clostridium perfringens* tipo A e a frequência de *Clostridium perfringens* tipo A enterotoxigênico em alimentos submetidos às análises rotineiras e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção

Amostras	nº de cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A	nº de cepas de <i>C. perfringens</i> cpe + (%)
Alimentos submetidos às análises rotineiras	49	1 (2,0)
Alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção	26	19 (73,1)
Total	75	20 (26,7)

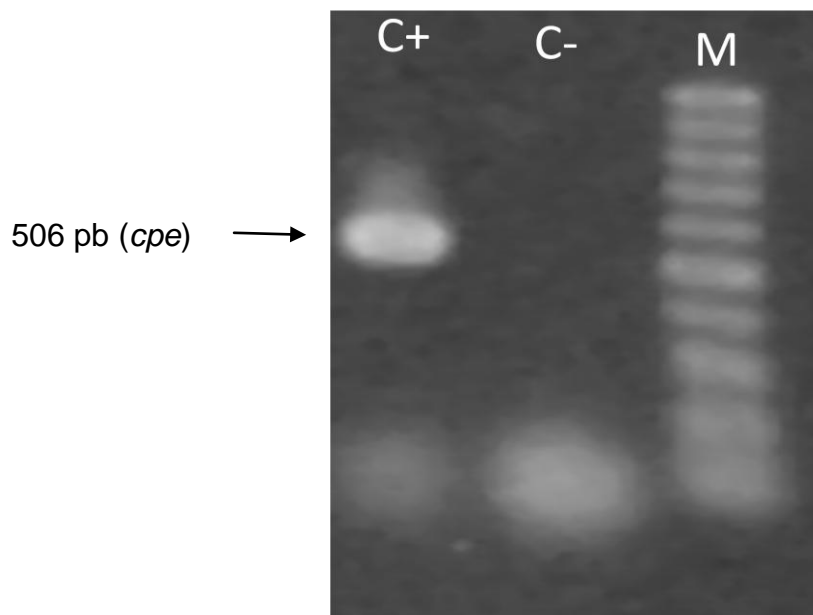


Figura 6. Detecção do gene *cpe* (segundo Baums *et al.*, 2004, com modificações). **C+:** *C. perfringens* *cpe*-positivo, **C-:** controle negativo; **M:** marcador de peso molecular (100 pb).

A elevada frequência de cepas de *C. perfringens* tipo A e a baixa ocorrência de cepas enterotoxigênicas isoladas de amostras de alimentos submetidos à análise rotineira estão de acordo com o relatado por outros pesquisadores. Yuan-Tong e Labbé (2003) analisaram 132 amostras de alimentos do mercado varejista dos Estados Unidos e verificaram a presença de *C. perfringens* em 39 (30%) amostras. Todos os isolados obtidos foram tipados como *C. perfringens* tipo A não enterotoxigênico. Resultado semelhante foi encontrado por Wen e McClane (2004), que ao analisarem aproximadamente 900 amostras de alimentos, também do mercado varejista americano, verificaram a presença de *C. perfringens* em 31,3% das amostras. Todos os isolados analisados foram tipados como *C. perfringens* tipo A, sendo apenas 1,4% considerados potencialmente enterotoxigênicos, por apresentarem o gene *cpe*.

A elevada frequência de *C. perfringens* tipo A encontrada no presente estudo, dentre os isolados de solo e de fezes de animais, e a baixa ocorrência de cepas enterotoxigênicas também estão de acordo com os resultados encontrados por

outros pesquisadores. Kalender *et al.* (2005), na Turquia, encontraram 95% dos ovinos sadios examinados portando *C. perfringens* tipo A não enterotoxigênico.

Por sua vez, estudos realizados nos Estados Unidos apesar de indicarem elevada freqüência de *C. perfringens* tipo A, relataram também a detecção de outros tipos, bem como a presença do gene *cpe*. Li *et al.* (2007) identificaram 97,6% dos 720 isolados bacterianos provenientes de solo como sendo tipo A, os outros tipos encontrados foram C (0,1%), D (1,3%) e E (1,0%). O gene *cpe* foi encontrado em 7% das amostras examinadas. Gurjar *et al.* (2008) relatam a ocorrência de *C. perfringens* tipo A em 93% das amostras de fezes de bovinos examinadas, sendo as demais pertencentes aos tipos B e E. Dentre os isolados bacterianos 4,5% apresentaram-se como potencialmente enterotoxigênicos por abrigarem *cpe*.

A contaminação cruzada dos alimentos por solo ou fezes de animais é freqüentemente relacionada à ocorrência de surtos ou casos de ETA causados por *C. perfringens*. Os dados do presente estudo, apesar de restritos, indicam a baixa probabilidade de isso ocorrer, uma vez que a totalidade das cepas dessas fontes não se mostrou potencialmente toxigênicas.

4.5. Determinação da localização do gene *cpe* em cepas de *C. perfringens* tipo A

Das 20 cepas *cpe* positivas, 13 (65%) apresentaram a amplificação tanto do gene *cpe* (de aproximadamente 0,6 kb), como do fragmento de *cpe*-IS1470 (aproximadamente 1,3 kb), indicando que o gene *cpe* estava localizado no cromossomo. As demais amostras (35%) apresentaram apenas amplificação do fragmento relativo ao gene *cpe* (aproximadamente 0,6 kb), não sendo possível determinar sua localização (Figura 7). Na Tabela 8 encontra-se a identificação dessas cepas e a localização do gene *cpe*.

Para confirmar a localização do *cpe* nas amostras e validar o protocolo empregado, a utilização de cepas de *C. perfringens* portadoras de *cpe* plasmidial ou cromossomal deveriam ser usadas como controle positivo. Entretanto, não foi possível obter, no país ou fora dele, cepas sabidamente portadoras desses genes. Assim, esses resultados devem ser avaliados com cautela.

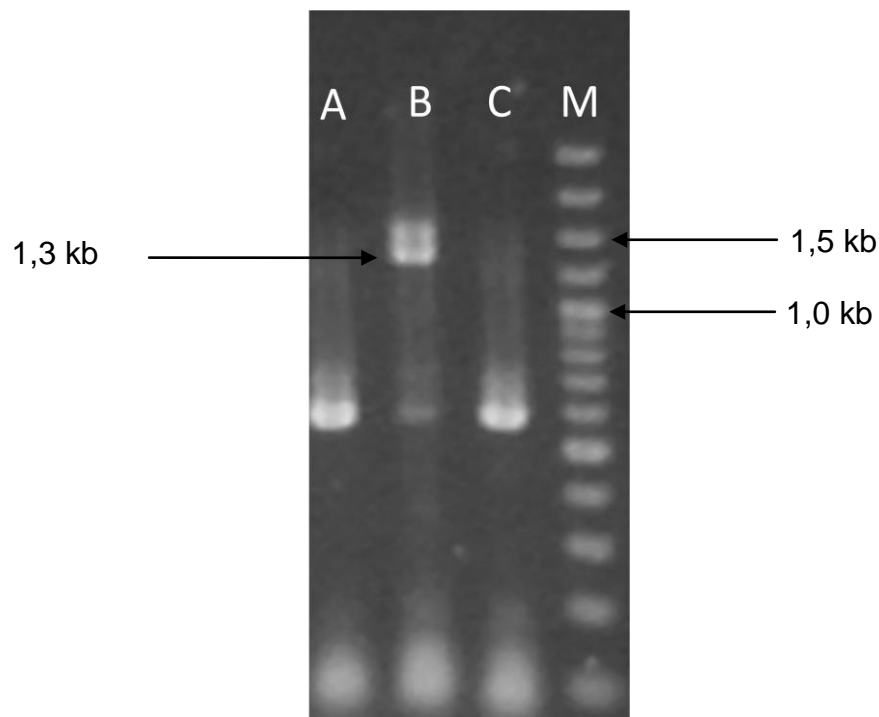


Figura 7. Determinação da localização do gene *cpe* de *C. perfringens* empregando-se Multiplex PCR, segundo Miyamoto *et al.* (2004). **A** e **C**: cepas *cpe* de localização indeterminada; **B**: cepas de *cpe* cromossomal; **M**: marcador de peso molecular (100 pb plus).

Tabela 8. Localização do gene *cpe* em amostras de *C. perfringens* isolados de alimentos submetidos as análises rotineiras e de alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.

Amostras	Identificação	Localização do gene <i>cpe</i>
farinha de trigo	109	Cromossomal
carne assada – cupim	078 a 082*	Indeterminado
frango ao molho cozido	083 a 084*	Cromossomal
cupim assado	085 a 086*	Indeterminado
jardineira de carne cozida	087 a 091*	Cromossomal
filé de frango com milho cozido	092 a 096*	Cromossomal

*Amostra suspeitas de surtos

Estudos relacionando a presença de *cpe* e sua localização, em alimentos, são bastante raros.

A maior frequência de cepas enterotoxigênicas portadoras de *cpe* com localização cromossomal encontrada nesse estudo está de acordo com os resultados encontrados por Wen e McClane (2004). Esses autores relatam que ao analisarem aproximadamente 900 amostras de alimentos do mercado varejista americano, observaram que em todos os isolados enterotoxigênicos (1,4%) o gene *cpe* se apresentava no cromossomo.

Assim como no presente trabalho, outros estudos relataram o isolamento de cepas de *C. perfringens* cuja localização do gene *cpe* não pode ser determinada. Heikinheimo *et al.* (2006), na Finlândia, avaliaram a presença do gene *cpe* em 136 amostras de fezes de manipuladores de alimentos que não apresentavam sintomas gastrointestinais. Em 25 dessas amostras (18%), através de Nested PCR, foi verificada presença do gene *cpe*, porém o isolamento de cepas de *C. perfringens* *cpe*-positivo ocorreu em apenas 11 amostras. Quanto à localização de *cpe*, cinco cepas apresentaram o arranjo genético IS1151-*cpe*, quatro apresentaram *cpe*-IS1470-Like, um apresentou o gene localizado no cromossomo e duas amostras apresentaram cepas com localização de *cpe* desconhecida. Em uma amostra foi observada tanto a presença de cepas *cpe*-IS1470-Like quanto *cpe*-IS1151. As cepas que apresentaram localização do gene *cpe* desconhecida foram submetidas à técnica de PFGE-Southern Blotting, e verificou-se que estas apresentavam o gene localizado em plasmídeos.

Li *et al.* (2007) verificaram que dos 100% dos 37 isolados de *C. perfringens* provenientes de solo apresentaram o gene *cpe* localizado em plasmídeos, sendo que 21 desses isolados (56,7%) apresentaram arranjo genético *downstream* IS1151 e 14 (37,8%) apresentaram o arranjo IS1470-Like. Duas cepas apresentaram localização indeterminada do gene *cpe*.

De acordo com Heikinheimo *et al.* (2006), a existência de cepas cuja localização do gene *cpe* não pode ser determinada pode ser explicado pela grande variedade genética existente entre as cepas de *C. perfringens* *cpe*+.

Em ambos os trabalhos citados anteriormente, a localização plasmidial do gene *cpe*, só foi possível após a utilização de PFGE-Southern Blotting.

Estudos adicionais com esses isolados devem ser realizados a fim de se tentar identificar a localização do gene *cpe*.

4.6. Análise do perfil de macro-restrição do DNA após eletroforese em campo pulsado (PFGE)

As cepas de *C. perfringens* foram submetidas à PFGE após restrição enzimática com a enzima *Sma*I. Em apenas quatro (2,7%) das 146 cepas analisadas não foi possível realizar a subtipagem devido à degradação do DNA durante a eletroforese, apesar do emprego de 50 µM de tiouréia no tampão de corrida.

A degradação do DNA durante a PFGE ocorre com diversas espécies bacterianas, tais como *Salmonella* ser. Ohio (KOORT *et al.*, 2002), *Streptomyces lividans* (RAY *et al.*, 1992) e *Clostridium difficile* (CORKILL *et al.*, 2000).

Com *C. perfringens* isso também já foi verificado por Maslanka *et al.* (1999) que ao subtiparem 62 cepas provenientes de sete surtos de toxinfecção alimentar, encontraram a presença de DNA degradado em 8% dessas cepas. Nauerby *et al.* (2003), ao analisarem a diversidade genética de 237 isolados de *C. perfringens* provenientes de frangos de corte dinamarqueses, obtiveram 3,5% de cepas não subtipáveis por esse método.

Foram obtidos pela PFGE, 69 perfis genéticos distintos, sendo esses designados como P1 a P69 (Tabela 9). O número de fragmentos de DNA variou entre oito e 16, e o tamanho deles variou entre 20,5 e 1.135 Kb.

Conforme pode ser verificado na Tabela 9, 42 perfis foram exclusivos para somente uma cepa, indicando uma grande variabilidade genética, mesmo entre diferentes colônias de uma mesma amostra de alimentos, fezes ou solo.

Somente um perfil (P19) abrigou cepas de origens distintas, alimentos e solo (Tabela 9). Os perfis obtidos para bovinos e ovinos também foram diferentes entre si e daqueles obtidos para cepas de origem alimentar.

As 75 cepas de *C. perfringens* de origem alimentar geraram 24 perfis PFGE distintos, sendo nove destes exclusivos para uma única cepa.

Ao perfil P2 pertence o maior número de cepas provenientes de amostras de diferentes alimentos (23). Essas cepas foram isoladas de seis amostras de alimentos provenientes de localidades diferentes, porém pertencentes a um mesmo tipo de

produto (carne moída crua). Esse resultado pode indicar a disseminação desse perfil genético de *C. perfringens* na cadeia produtiva/distribuição de carnes.

As 19 cepas isoladas de alimentos suspeitos de causarem surtos e que apresentaram amplificação do gene *cpe* pertenceram aos perfis P14 (078 a 082), P15 (083 a 084), P16 (085 a 086), P17 (087 a 091) e P18 (092 a 096). Não foi observada variação no perfil genético de cepas de uma mesma amostra de alimento, indicando que cada surto foi causado por um único clone. A cepa de *C. perfringens* *cpe* positivo isolada de amostra de alimento submetida à análise rotineira foi alocada no perfil P21, diferente das demais *cpe* positivas.

Os isolados de *C. perfringens* provenientes de fezes de animais resultaram em 10 perfis PFGE distintos (P60 a P69). As cepas provenientes de um mesmo animal apresentaram perfis indistinguíveis, com exceção das cepas pertencentes ao perfil 66 que foram isoladas de dois bovinos diferentes, porém abrigados em um mesmo curral.

As cepas de *C. perfringens* provenientes de amostras de solo apresentaram uma diversidade genética muito maior, quando comparadas com as amostras de fezes de animais e alimentos. Dentre os 43 isolados de *C. perfringens*, provenientes de apenas 10 amostras de solo, foram obtidos 36 perfis PFGE distintos, sendo 31 destes exclusivos para uma única cepa. Os perfis P27, P41, P50 e P57 apresentaram, cada um, duas cepas de *C. perfringens* provenientes de uma mesma amostra de solo. Entretanto, ao perfil P19 pertencem duas cepas de *C. perfringens* provenientes de amostras de solo de diferentes origens. A esse perfil pertencem também três cepas de *C. perfringens* isoladas de dois alimentos distintos, indicando que um determinado genótipo pode estar amplamente disseminado.

A fim de verificar a relação genética entre os diferentes perfis encontrados construiu-se um dendrograma empregando-se o coeficiente de Dice e UPGMA. Conforme pode ser verificado na Figura 8 os perfis P14, P15, P16, P17, P18 e P21, que abrigaram cepas *cpe* positivas, pertenceram a um mesmo cluster, indicando um possível ancestral comum. Entretanto, o perfil P11 que abrigou duas cepas não portadoras de *cpe* também faz parte desse cluster. Uma provável explicação para a presença desse perfil (P11) nesse cluster é a perda do gene *cpe*, já que as cepas pertencentes a esse perfil (072 e 073) foram isoladas de amostras suspeitas de causar intoxicação alimentar.

Um outro cluster, exclusivo para cepas provenientes de amostras de alimentos foi o que reuniu os perfis P1 e P2, este último abrigando maior número de cepas (23). Observou-se que quase a totalidade dos clusters formados abrigaram cepas de diferentes origens.

A elevada variabilidade genética observada, associada à baixa similaridade entre os clusters, indica ausência de correlação epidemiológica entre eles.

Baixa similaridade genética entre cepas isoladas de amostras não relacionadas epidemiologicamente foi observada por outros pesquisadores. Maslanka *et al.* (1999), nos Estados Unidos, ao avaliarem a diversidade genética de 62 cepas de *C. perfringens* isoladas de alimentos responsáveis por surtos observaram grande variabilidade genética. Johansson *et al.* (2006) ao avaliarem 101 cepas de *C. perfringens* tipo A isoladas de animais, lodo e alimentos responsáveis por surtos, provenientes da Suécia e da Noruega, observaram uma baixa similaridade entre as cepas de diferentes amostras.

Tabela 9. Relação dos perfis genéticos obtidos pelas análises por PFGE após restrição enzimática com SmaI em cepas provenientes de alimentos, solo e fezes de ovinos e bovinos.

Perfil PFGE (nº de cepas)	Identificação das cepas*	Origem
P1 (1)	007	Alimento
P2 (23)	008 a 011, 017 a 021, 023 a 025, 027 a 037	Alimento
P3 (2)	022 e 026	Alimento
P4 (2)	038 e 039	Alimento
P5 (1)	42	Alimento
P6 (2)	043 a 044	Alimento
P7 (2)	066 a 067	Alimento
P8 (1)	68	Alimento
P9 (1)	69	Alimento
P10 (1)	70	Alimento
P11 (2)	071 a 072	Alimento
P12 (2)	073 a 074	Alimento
P13 (3)	075 a 077	Alimento
P14 (5)	078 a 082	Alimento
P15 (2)	083 a 084	Alimento
P16 (2)	085 a 086	Alimento
P17 (5)	087 a 091	Alimento
P18 (5)	092 a 096	Alimento
P19 (5)	099 , 116, 117, s48, s58	Alimento / solo
P20 (1)	100	Alimento
P21 (1)	109	Alimento
P22 (1)	111	Alimento
P23 (4)	122 a 125	Alimento
P24 (1)	126	Alimento
P25 (1)	s1	Solo
P26 (1)	s3	Solo
P27 (2)	s5 e s7	Solo
P28 (1)	s8	Solo
P29 (1)	s9	Solo
P30 (1)	s10	Solo
P31 (1)	s11	Solo
P32 (1)	s12	Solo
P33 (1)	s13	Solo

Cont.

Continuação tabela 9

P34 (1)	s14	Solo
P35 (1)	s15	Solo
P36 (1)	s16	Solo
P37 (1)	s17	Solo
P38 (1)	s19	Solo
P39 (1)	s22	Solo
P40 (1)	s32	Solo
P41 (2)	s34 e s37	Solo
P42 (1)	s41	Solo
P43 (1)	s44	Solo
P44 (1)	s46	Solo
P45 (1)	s47	Solo
P46 (1)	s54	Solo
P47 (1)	s56	Solo
P48 (1)	s57	Solo
P49 (1)	s61	Solo
P50 (2)	s63 e s65	Solo
P51 (1)	s64	Solo
P52 (1)	s66	Solo
P53 (1)	s68	Solo
P54 (1)	s72	Solo
P55 (1)	s73	Solo
P56 (1)	s74	Solo
P57 (2)	s76 e s77	Solo
P58 (1)	s80	Solo
P59 (1)	s84	Solo
P60 (5)	a1 a a5	Animal (ovino)
P61 (2)	a43 e a45	Animal (ovino)
P62 (1)	a56	Animal (bovino)
P63 (3)	a57 e a59	Animal (bovino)
P64 (1)	a79	Animal (bovino)
P65 (4)	a86 a a89	Animal (bovino)
P66 (3)	a90, a98 e a99	Animal (bovino)
P67 (2)	a106 e a109	Animal (bovino)
P68 (3)	a107, a108, a110	Animal (bovino)
P69 (5)	a116 a a120	Animal (bovino)

* para identificação da amostra consulte as tabelas 4, 5 e 6.

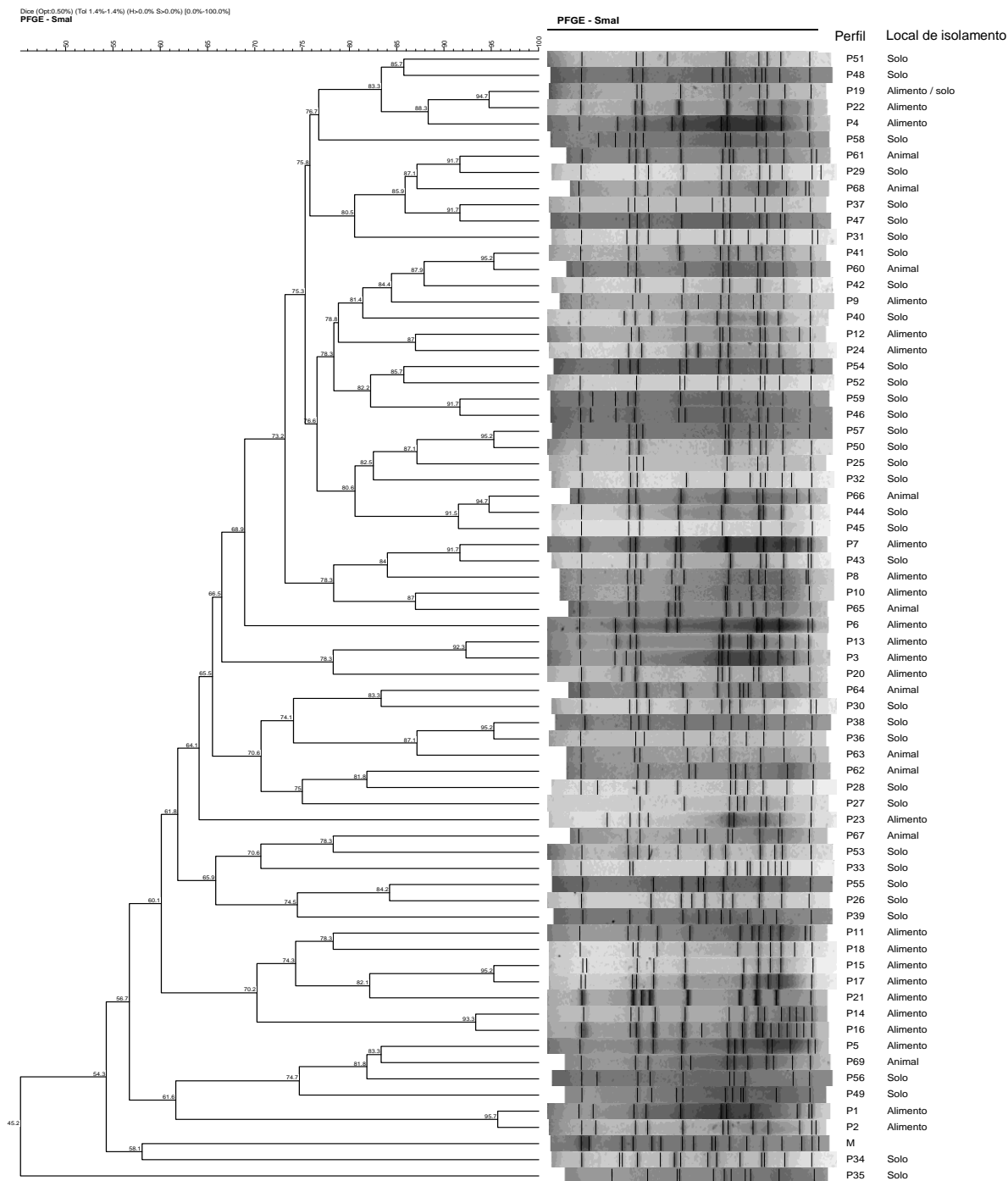


Figura 8. Representação da relação genética de 69 perfis PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) de cepas de *C. perfringens*, obtidos através da enzima SmaI. **M** – marcador de peso molecular (*Salmonella* Braenderup).

4.7. Detecção de enterotoxina

Os métodos moleculares como a PCR se mostram eficientes para a detecção da presença do gene *cpe*, responsável pela codificação da enterotoxina de *C. perfringens*. Entretanto, os métodos moleculares são capazes apenas de identificar cepas potencialmente enterotoxigênicas, mas não permitem saber se a cepa irá expressar esse gene (LUKINMMA *et al.*, 2002). Sendo assim, as cepas de *C. perfringens* que apresentaram o gene *cpe* foram avaliadas quanto à sua capacidade em produzir CPE, empregando-se a aglutinação passiva de látex invertida (PET-RPLA). Dentre as 20 cepas analisadas, não foi possível detectar a produção de enterotoxina em cinco (25%) uma vez que as mesmas não esporularam no meio Duncan Strong modificado, conforme verificado por microscopia. Essas cepas haviam sido obtidas de uma única amostra de alimento (Tabela 10).

Dentre as sete cepas que não apresentaram o arranjo genético conhecido (*IS1470*, *IS1151* ou *IS1470-Like*), duas (85 e 86) foram capazes de produzir enterotoxinas “*in vitro*”, mostrando que o gene *cpe* se apresentava funcional. Resultados similares foram obtidos por Heikinheimo *et al.* (2006) ao analisar cepas *C. perfringens cpe+*, provenientes de amostras de fezes de manipuladores de alimentos na Finlândia. Segundo os autores, uma de duas cepas, na qual a localização do gene *cpe* não pode ser determinada, foi capaz de produzir CPE *in vitro*.

Tabela 10. Detecção de enterotoxina de *C. perfringens* em cepas de *C. perfringens* tipo A portadoras do gene *cpe* em alimentos submetidos às análises rotineiras e alimentos suspeitos de causarem toxi-infecção.

Amostras	Identificação	nº de cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A	Localização do gene <i>cpe</i>	Detecção de CPE
Farinha de trigo	109	1	Cromossomal	1
Carne assada – cupim	078 a 082	5	Indeterminado	-
Frango ao molho cozido	083 a 084	2	Cromossomal	2
Cupim assado	085 a 086	2	Indeterminado	2
Jardineira de carne cozida	087 a 091	5	Cromossomal	5
Filé de frango com milho cozido	092 a 096	5	Cromossomal	5

Os resultados obtidos através desse trabalho fornecem subsídios para melhorar os conhecimentos sobre as características das cepas circulantes em nosso meio, além de mostrar a baixa relação entre clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*. Entretanto, ainda existem pontos que precisam ser estudados e elucidados, como, por exemplo, identificar o principal reservatório e a fonte de disseminação de *C. perfringens* tipo A enterotoxigênico para os alimentos.

5. CONCLUSÃO

- A utilização de clostrídios sulfito redutores, ou mesmo de *C. perfringens*, como indicador de possível risco à saúde dos consumidores pode levar à condenação desnecessária de alimentos, uma vez que existe baixa correlação entre clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* independente da fonte de isolamento, além da baixa frequência do gene *cpe* em *C. perfringens*.

- *C. perfringens* tipo A foi o único tipo toxigênico encontrado, independentemente da fonte de isolamento.

- Solo e fezes de animais não se mostraram reservatórios potenciais para *C. perfringens* enterotoxigênicos.

- A maioria das cepas enterotoxigênicas de *C. perfringens* tipo A isoladas de alimentos apresentaram o gene *cpe* cromossomal. A produção “in vitro” de CPE foi demonstrada.

- Uma grande diversidade genética entre as cepas de *C. perfringens* foi observada, sem que tenha observada correlação entre essas cepas e a fonte de isolamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciências e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.

ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P.E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.145-155, 1995.

ASCHFALK, A.; YOUNAN, M.; DROCHNER, W.; MÜLLER, W. The distribution and frequency of *Clostridium perfringens* toxinotypes in healthy sheep in Benin, West Africa. **Tropical Animal Health and Production**, v.34, p.289-293, 2002.

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.

BLÖCKER, D.; BEHLKE, J.; AKTORIES, K.; BARTH, H. Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.2980-2987, 2001.

BRASIL. Resolução RDC n.12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamentos técnicos sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.7E, 10 jan. 2001. Seção I, p.46-53.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P.E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.195-202, 2002.

BRYNESTAD, S.; SYNSTAD, B.; GRANUM, P.E. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. **Microbiology**, v.143, p.2109-2115, 1997.

BULLIFENT, H.L.; MOIR, A.; AWAD, M.M.; SCOTT, P.T.; ROOD, J.I.; TITBALL, R.W. The level of expression of α -toxin by different strains of *Clostridium perfringens* is dependent on differences in promoter structure and genetic background. **Anaerobe**, v.2, p.365-371, 1996.

CORKILL, J.E.; GRAHAM, R.; HART, C.A.; STUBBS, S. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2791-2792, 2000.

CZEUZULIN, J.R.; HANNA, P.C.; McCLANE, B.A. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.61, n.8, p.3429-3439, 1993.

DE JONG, A.E.I.; ROMBOUTS, F.M.; BEUMER, R.R. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.71-80, 2004.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, p.297-302, 1945.

DUNCAN, C.L. Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Bacteriology**, v.113, n.2, p.932-936, 1973.

DUNCAN, C.L.; KING, G.J.; FRIEBEN, W.R. A paracrystalline inclusion formed during sporulation of enterotoxin-producing strains of *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Bacteriology**, v.114, n.2, p.845-859, 1973.

FLORES-DIAZ, M.; THELESTAM, M.; CLARK, G.C.; TITBALL, R.W.; ALAPE-GIRÓN, A. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. **Anaerobe**, v.10, p.115-123, 2004.

GAMBOA, M.M.; RODRÍGUEZ, E.; VARGAS, P. Diversity of mesophilic clostridia in Costa Rican soils. **Anaerobe**, v.11, p.322-326, 2005.

GRANUM, P.E. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p.101-112, 1990.

GURJAR, A.A.; HEGDE, N.V.; LOVE, B.C.; JAYARAO, B.M. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.90-95, 2008.

HANG´OMBE, B.M.; ISOGAI, E.; LUNGU, J.; MUBITA, C.; NAMBOTA, A.; KIRISAWA, R.; KIMURA, K.; ISOGAI, H. Detection and characterization of *Clostridium perfringens* species in soil of Zambia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.23, p.277-284, 2000.

HATHEWAY, C.L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.1, p.66-98, 1990.

HEIKINHEIMO, A.; LINDSTRÖM, M.; GRANUM, P. E.; KORKEALA, H. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.11, p.1724-1729, 2006.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Philadelphia: The Williams & Wilkins, 1994. p. 559-564. Group 18.

HUANG, I.; WATERS, M.; GRAU, R.R.; SARKER, M.R. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. **FEMS Microbiology Letters**, v.223, p.233-240, 2004.

HUNTER, S.B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M.A.; DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel

electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1045-1050, 2005.

JOHANSSON, A.; ASPAN, A.; BAGGE, E.; BAVERUD, V.; ENGSTRÖM, B.E.; JOHANSSON, K. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. **BCM Microbiology**, v.6, n.47, p.1-12, 2006.

KALENDER, H.; ERTAS, H.B.; CETINKAYA, B.; MUZ, A.; ARSLAN, N.; KILIC, A. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. **Veterinari Medicina**, v.50, n.10, p.439-442, 2005.

KALINOWSKI, R.M.; TOMPKIN, R.B.; BODNARUK, P.W.; PRUETT, W.P. Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, v.66, n.7, p.1227-1232, 2003.

KOKAI-KUN, J.F.; McCLANE, B.A. Deletion analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Infection and Immunity**, v.65, n.3, p.1014-1022, 1997.

KOORT, J.M.K.; LUKINMAA, S.; RANTALA, M.; UNKILA, E.; SIITONEN, A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.9, p.3497-3498, 2002.

LI, J.; McCLANE, B.A. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.4561-4568, 2006.

LI, J.; SAYEED, S.; McCLANE, B.A. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.22, p.7218-7224, 2007.

LUKINMMA, S.; TAKKUNEN, E.; SIITONEN, A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.3744-3749, 2002.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, 1998-2002. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.SS10, p.1-34, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>. Acesso em: 31 mar. 2009.

MASLANKA, S.E.; KERR, J.G.; WILLIAMS, G.; BARBAREE, J.M.; CARSON, L.A.; MILLER, J.M.; SWAMINATHAN, B. Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.7, p.2209-2214, 1999.

McCLANE, B.A. *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. p.423–444.

McCLANE, B.A. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. **Toxicon**, v.39, p.1781-1791, 2001.

McCLANE, B.A.; CHAKRABARTI, G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Anaerobe**, v.10, p.107-114, 2004.

McCLUNG, L.S. Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chicken: preliminary note. **Journal of Bacteriology**, v.50, p.229-231, 1945.

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.

MICLARD, J.; JÄGGI, M.; SUTTER, E.; WYDER, M.; GRABSCHEID, B.; POSTHAUS, H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.320-325, 2009.

MIYAMOTO, K.; CHAKRABARTI, G.; MORINO, Y.; McCLANE, B.A. Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. **Infection and Immunity**, v.70, n.8, p.4261-4272, 2002.

MIYAMOTO, K.; WEN, Q.; McCLANE, B.A. Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-Like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1552-1558, 2004.

MMWR. Surveillance for foodborne disease outbreaks --- United States, 2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.58, n.22, p.609-615, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5822a1.htm>. Acesso em: 10 out. 2009.

NAUERBY, B.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.257-266, 2003.

ORR, J.H.; REED, G.B. Serological types of *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v.40, n.3, p.441-448, 1940.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v.104, n.3, p.104–110, 1999.

POPOFF, M.R.; STILES, B.G. Clostridial toxins vs. other bacterial toxins. In: DÜRRE, P., ed. **Handbook on clostridia**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p.323–385.

RAY, T.; WEADEN, J.; DYSON, P. Tris-dependent site-related cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.96, p.247-252, 1992.

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Clostridium perfringens* In: UNITED STATES. Food and Drugs Administration. **Bacteriological analytical manual online**. Gaithersburg: FDA, 2001. cap.16. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070878>. Acesso em: 31 de julho de 2008.

ROBERTSON, S.L.; SMEDLEY, J.G.; SINGH, U.; CHAKRABARTI, G.; Van ITALLIE, C.M.; ANDERSON, J.M.; McCLANE, B.A. *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. **Cellular Microbiology**, v.9, n.11, p.2734-2755, 2007.

RODRÍGUEZ, E.; GAMBOA, M.M.; VARGAS, P. *Clostridium perfringens* in raw and cooked meats and its relation with the environment in Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.52, n.2, p.155-159, 2002.

ROOD, J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Review of Microbiology**, v.52, p.333-360, 1998.

SAKURAI, J.; DUNCAN, C. Some properties of beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C, **Infection and Immunity**, v.21, n.2, p.678-680, 1978.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3, pag. 653.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Tabelas/Planilhas de Surtos (1998 a 2002)**. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso em: 31 jul. 2008.

SARKER, M.R.; SHIVERS, R.P.; SPARKS, S.G.; JUNEJA, V.K.; McCLANE, B.A. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3234-3240, 2000.

SCHALCH, B.; SPERNER, B.; EISGRUBER, H.; STOLLE, A. Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, n.3, p.281-286, 1999.

SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, B.H.; SONGER, J.G.; TWETEN, R.K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers, **Infection and Immunity**, v.68, n.10, p.5546-5551, 2000.

SHIMIZU, T.; OHTANI, K.; HIRAKAWA, H.; OHSHIMA, K.; YAMASHITA, A.; SHIBA, T.; OGASAWARA, N.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; HAYASHI, H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.2, p.996-1001, 2002.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, p.225-420, 1980.

- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman, 1973. 573p. (Series of books in biology).
- SOLER-JOVER, A.; BLASE, J.; ARANDA, I.G.; NAVARRO, P.; GIBERT, M.; POPOFF, M.R.; MARTÍN-SATUÉ, M. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules *in vivo*. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.52, n.7, p.931-942, 2004.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.216-234, 1996.
- STARK, R.L.; DUNCAN, C.L. Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. **Infection and Immunity**, v.4, n.2, p.89-96, 1971.
- STILES, B.G.; WILKINS, T.D. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. **Infection and Immunity**, v.54, n.3, p.683-688, 1986.
- TITBALL, R.W.; NAYLOR, C.E.; BASAK, A.K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Anaerobe**, v.5, p.51-64, 1999.
- TSUTSUI, K.; MINAMI, J.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S.; TANIGUCHI, Y.; NAKAMURA, S.; NISHIOKA, M.; OKABE, A. Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.24, p.7164-7170, 1995.
- VAISHNAVI, C.; KAUR, S. *Clostridium perfringens* enterotoxin in antibiotic-associated diarrhea. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v.51, n.2, 198-199, 2008.
- WEISS, K.F.; STRONG, D.H. Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v.93, n.1, p.21-26, 1967.
- WELCH, W.H.; NUTTALL, G.H.F. A gas producing *Bacillus* (*Bacillus aerogenes capsulatus*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v.3, p.81-91, 1892.
- WEN, Q.; McCLANE, B.A. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2685-2691, 2004.
- WIECKOWSKI, E.U.; WNEK, A.P.; McCLANE, B.A. Evidence that an ~50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.14, p.10838-10848, 1994.
- YUAN-TONG, L.; LABBE, R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. **American Society for Microbiology**, v. 69, n.3, p. 1642, 1646, 2003.

7. ANEXOS

1. MEIO MOTILIDADE NITRATO

Extrato de carne - 3,0 g

Peptona de carne - 5,0 g

Nitrato de potássio - 1,0 g

Fosfato de sódio bibásico - 2,5 g

Agar - 3,0 g

Galactose - 5,0 g

Glicerina - 5,0 mL

pH 7,0 ± 0,2

2. REAGENTE A (Alfa-naftilamina solução 0,5% em ácido acético 5N)

0,5 g de alfa naftilamina

100 mL de ácido acético (5N)

3. REAGENTE B (Ácido sulfanílico solução 0,8% em ácido acético 5N)

0,8 g de ácido sulfanílico

100 mL de ácido acético 5N

4. MEIO LACTOSE-GELATINA

Triptose 15,0 g

Extrato de levedura - 10,0 g

Lactose 10,0 g

Vermelho fenol - 0,05 g

Gelatina - 120,0 g

pH 7,5 ± 0,2

5. MEIO DUNCAN AND STRONG MODIFICADO

Extrato de levedura – 4,0 g

Peptona de Proteose – 15,0 g

Amido solúvel – 4,0 g

Tioglicolato de sódio – 1,0 g

NaHPO₄·7H₂O – 2,5 g

pH 7,8 ± 0,1

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)