

ENTEROTOXEMIA, EM BOVINO DE 6 DIAS DE IDADE, PRODUZIDA PELO  
*Clostridium perfringens* TIPO A\*.

Enterotoxemia, in Six Days Old Bovine, by *Clostridium perfrin*  
*gens* Type A.

Danilo Saraiva\*\*

#### RESUMO

Bovino com 6 dias de idade, de um lote em que morreram 20 com igual sintomatologia, apresentou depressão, dificuldade ambulatória seguida de morte em menos de 24 horas.

Na necrópsia, a lesão principal situava-se no intestino delgado que estava fortemente congesto e com conteúdo hemorrágico.

Esfregaços corados pelos métodos de Gram e de Burri, feitos com raspados da mucosa intestinal, revelaram numerosos bacilos Gram positivos, capsulados, com extremidades ligeiramente arredondadas, isolados ou em diplobacilos, com morfologia semelhante à do *Clostridium perfringens*.

O sobrenadante do centrifugado do conteúdo intestinal, inocula do via I.V. na dose de 0,4 ml., em camundongos, matou-os em menos de 6 horas, com hemoglobinúria, demonstrando haver toxina preformada. Esta foi perfeitamente neutralizada pelo soro antiperfringens A.

Do fígado, foi isolado, em cultura pura, germe anaeróbio com morfologia semelhante à do encontrado no intestino. As provas bioquímicas e culturais revelaram tratar-se do *Clostridium perfringens* que a toxinotipia mostrou ser do tipo A.

Com apoio nos dados clínicos, nos de necrópsia, nos resultados dos exames bacteriológicos e, sobretudo, pela toxinotipia, chegou-se à conclusão de que a causa mortis foi enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo A, doença pela primeira vez diagnosticada na região em bovinos dessa idade.

#### SUMMARY

Calf, six days old, showed symptoms of disease and died in less than 24 hours later.

\* Este trabalho foi relatado durante o V Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Porto Alegre, 26-29.07.1977.

\*\* Professor Titular do Departamento de Clínicas Veterinárias - UFSM.

The autopsy showed that the small intestine was redish and its contents was hemorrhagic.

Nineteen others calves, with equal symptoms and lesions, died some days before.

In an investigation of the problem, equal volumes of saline were added to the intestinal contents and then centrifuged. Mice inoculated I.V. with 0.4 ml. of the supernatant fluid died within 6 hours indicating presence of toxins. Mice inoculated with toxins neutralized by type A antiperfringens serum survived for 3 days.

Smears made with scraps from the intestinal mucosa, stained by Gram's and Burri's methods showed absolute predominance of Gram positive capsulated bacilli morphologically similar to *Clostridium perfringens*.

Germes similar to those found in the intestine have been cultivated from the liver in pure culture form.

Identification and serum neutralization tests were found to be *Clostridium perfringens* type A the germ isolated from the dead animal.

#### INTRODUÇÃO

As doenças produzidas pelas bactérias anaeróbias são, sem dúvida, as que maiores prejuízos causam à produção animal em todo o mundo.

Entre elas, estão as enterotoxemias, produzidas pelos diversos tipos do *Clostridium perfringens*. Este germe possui amplo espectro patogênico, causando doenças e mortes em todas as espécies domésticas.

Revisão completa sobre as doenças por ele produzidas foi feita por PRÉVOT, TURPIN & KAISER (8). Esses mesmos autores, foram os primeiros a assinalar a crescente freqüência das enterotoxemias pelo *Clostridium perfringens* tipo A nas diversas espécies. LÜCHTER & COLAK (6) revisaram o problema em bovinos.

Doença quase que só diagnosticada nos ovinos, as enterotoxemias vêm aumentando dia a dia sua freqüência entre os bovinos, mormente entre os bezerros e de modo especial nos que estão nos poteiros de engorda intensiva nos Estados Unidos. Têm sido causadas, especialmente, como indica FINCHER (1), pelos tipos A, C, D do *Clostridium perfringens* e pelo *Clostridium sordellii*.

GRINER (2) afirma que o tipo C é o dominante nos Estados Unidos.

GRINER & BRACKEN (3) referem enterotoxemia hemorrágica em bezerro de 3 dias de idade, produzida pelo tipo C.

Na França, MORAILLON & YALCIN (7) indicam o predomínio do tipo A como agente de enterotoxemias em bovinos e KATITCH (5) também as

sinala a frequência desse tipo como agente patogênico, não só em bovinos como nas outras espécies.

SARAIVA (10) relatou caso ocorrido em 1976, de enterotoxemia em bovino de 10 meses, em teste de ganho de peso, produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A.

O presente trabalho relata caso de enterotoxemia em bezerro de apenas 6 dias de idade. Decidiu-se fazer esta comunicação por não terem sido encontradas publicações a respeito, de casos semelhantes, no Rio Grande do Sul.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*História do caso* - O material do presente estudo proveio de bovino de 6 dias de idade. Era o 20º animal morto com igual sintomatologia, em propriedade situada no município de Soledade, no Rio Grande do Sul.

Foi observada depressão, anorexia, dificuldade ambulatória, sobrevivendo a morte num período de 24 horas. Alguns morreram quase sem ter mostrado sintomas.

*Exames realizados* - Após a necrópsia e para pesquisa de toxina préformada, o conteúdo intestinal foi misturado com igual volume de soro fisiológico e a seguir centrifugado a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e dividido em duas partes. Uma delas foi adicionada de soro antiperfringens A\*. Ambas partes foram mantidas durante 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foram inoculadas em camundongos adultos, na dose de 0,4 ml. via I.V., os quais foram observados durante 3 dias.

Do fígado foram feitas culturas em ágar-sangue e em meio de carne cozida de Robertson.

O germe isolado em cultura pura em ágar-sangue, em anaerobiose, foi semeado em meio de Robertson com amido para obtenção de toxina para toxinotipia.

Outros meios também foram semeados para fins de identificação do germe isolado: leite tornasolado, meio de tioglicolato com lactose, sacarose e salicina. Foram pesquisadas a hidrólise da gelatina, produção de indol, de H<sub>2</sub>S e de nitratos. A toxinotipia foi executada conforme as instruções dos fabricantes dos soros antiperfringens específicos utilizados na prova e já referidos e ainda segundo as indicações de SMITH & HOLDEMAN (11), usando camundongos.

Pesquisas de hemolisina e de lecitinase bem como as provas de inibição das mesmas com os soros antiperfringens acima indicados, fo

\* Preparados por Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Inglaterra.

ram feitas conforme indicações de PRÉVOT (9).

Colorações foram efetuadas tanto pelo método de Gram como pelo de Burri, do conteúdo intestinal, de raspados da mucosa entérica e das culturas obtidas.

## RESULTADOS

Verificou-se, na necrópsia, que o intestino delgado estava, externamente, avermelhado. Seu conteúdo era constituído por uma massa viscosa, hemorrágica. Continha numerosas bolhas de gás disseminadas pela massa.

O fígado estava bastante congesto e mais escuro.

A bexiga mostrava algumas equimoses em sua mucosa, mas a urina era clara.

Os rins apresentavam-se avermelhados, com algumas manchas na superfície.

Os restantes órgãos tinham, macroscopicamente, aspecto normal.

A cultura em meio de Robertson, a partir do fígado, mostrou crescimento abundante de germe que turvou fortemente o meio, com grande produção de gás. A carne permaneceu rosada.

Esse germe era Gram positivo, imóvel, reto, com extremidades ligeiramente arredondadas. Os bacilos estavam isolados ou em diplococos. Em placas de ágar-sangue em anaerobiose, mostrou-se em cultura pura. Formou colonias regulares, convexas, brilhantes, lisas, acinzentadas a esverdeadas, com 2 a 3 mm de diâmetro. Eram cercadas por uma zona de hemólise com duplo halo.

Fermentou glicose, sacarose, lactose mas não a salicina.

O leite tornasolado foi acidificado e rapidamente coagulado, com produção de gás. A gelatina foi liquefeita e os nitratos reduzidos. As provas de lecitinase e de hemólise foram positivas. Ambas foram inibidas pelo soro antiperfringens tipo A.

Esfregaços preparados com raspados da mucosa entérica da zona avermelhada, corados pelos métodos de Gram e de Burri, permitiram verificar uma absoluta predominância de bacilos Gram positivos, capsulados, que mostravam as mesmas características morfológicas do isolado do fígado.

No sobrenadante do centrifugado de conteúdo entérico foi encontrada abundante toxina preformada. Inoculada via I.V. em camundongos na dose de 0,4 ml. matou-os em menos de 6 horas com hemoglobínúria. Ela foi neutralizada pelo soro antiperfringens tipo A.

Na toxinotipia, realizada com a toxina obtida pela cultura do germe em meio de Robertson com amido, foi observada completa proteção dos camundongos inoculados com toxina neutralizada pelo soro antiperfringens tipo A. A tripsinização da toxina destruiu sua ativi

dade letal, com sobrevivência dos camundongos inoculados.

A Tabela 1 representa o conjunto das provas de toxinotipia.

Tabela 1. Toxinotipia

CAMUNDON GOS (Nº)	TOXINA		CALDO SIM PLES (ml.)	SORO ANTIPERFRIN GENS TIPO A (ml.)	RESULTADO
	Não Tripsini zada (ml.)	Tripsiniza da (ml.)			
2	0,6	-	0,3	-	Morreram entre 3 e 5 horas com hemoglobi núria.
2	0,6	-	0,2	0,1	Sobreviveram
2	-	0,6	0,3	-	Sobreviveram

DOSE: 0,4 ml. via I.V. em cada camundongo de 20 g de peso. Observação durante 3 dias.

As culturas permitiram o isolamento de um germe que os demais exames bacterioscópicos, bioquímicos e de patogenicidade indicaram ser o *Clostridium perfringens*. No sobrenadante do centrifugado de conteúdo intestinal havia abundante toxina preformada. Esse achado caracteriza a enterotoxemia segundo os conceitos de GRINER (3), KA TITCH (4), SMITH & HOLDEMAN (11) e de PRÉVOT et alii (8).

A toxinotipia realizada tanto a partir dessa toxina preformada como da produzida em meio de Robertson, evidenciou tratar-se de toxinas semelhantes. Ambas foram totalmente neutralizadas pelo soro antiperfringens A que neutraliza unicamente a toxina produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A.

Os sintomas apresentados pelo animal e as lesões macroscópicas combinam perfeitamente com os resultados das pesquisas bacteriológicas. razão pela qual pode-se afirmar que o bovino, objeto desta pesquisa, morreu por enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo A.

#### CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados de todos os exames realizados, conclui-se que:

1. De um bezerro de 6 dias de idade, morto de enterotoxemia, foi isolado o *Clostridium perfringens* tipo A.
2. Trata-se do primeiro caso diagnosticado laboratorialmente na região em bovino dessa idade.

## LITERATURA CITADA

1. FINCHER, M. G. - Diseases of Calves. In: GIBBONS, W. Y. (ed.) *Diseases of Cattle*. 2<sup>a</sup> ed., Santa Barbara, Walter J. Gibbons, 1963, p.399-419.
2. GRINER, L. A. - Some Factors Influencing the Incidence of Enterotoxaemia in Domestic Animals. *Bull. Off. Int.Epiz.*, 59(9-10):1443-1451, 1963.
3. GRINER, L. A. & BRACKEN, F. K. - *Clostridium perfringens* (type C) in Acute Hemorrhagic Enteritis of Calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 122:99-103, 1953.
4. KATITCH, R. V. - Les Maladies des Animaux Domestiques Causées par les Microbes Anaérobies. Paris, Vigot Frères, 1965, 216 p.
5. KATITCH, R. V. - Aspects Actuels de l'Épizootologie des Maladies du Mouton Causées par les Anaérobies. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 65(9-10):1683-1710, 1966.
6. LÜTCHTER, F. J. & COLAK, M. - Enterotoxemia en bovinos. *Gaceta Veterinaria*, 109:195-200, 1957.
7. MORAILLON, P. & YALCIN, N. - Formes Nouvelles de Gastro-entérotoxémies et Rôle Étiologique des Aliments du Bétail. *Rec. Med. Vet.*, 142(10):935-947, 1966.
8. PRÉVOT, A. R.; TURPIN, A. & KAISER, P. - Les Bactéries Anaérobies. Paris, Dunod, 1967, 2.188 p.
9. PRÉVOT, A. R. - Techniques pour le Diagnostic des Bactéries Anaérobies. Saint Mandé, La Tourelle, 1964, 119 p.
10. SARAIVA, D. - Enterotoxemia, em bovinos de 10 meses de idade, produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo A. *Rev. Centro Ciências Rurais*, 8(2):147-152, 1978.
11. SMITH, L. DS. & HOLDEMAN, L. V. - *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Springfield, Charles C. Thomas, 1968, 423 p.