

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudo comparativo das clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia
Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DJEISON LUTIER RAYMUNDO

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudo comparativo das clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia
Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Autor: Djeison Lutier Raymundo

Tese apresentada como um dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de concentração em
Patologia Veterinária, na Universidade Federal
do Rio Grande do Sul

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE

2010

DJEISON LUTIER RAYMUNDO

ESTUDO COMPARATIVO DAS CLOSTRIDIOSES DIAGNOSTICADAS NO
SETOR DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

Aprovado em 20 de maio de 2010

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Ana Lúcia Schild
Membro da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Darlei Leureano Raymundo e Vera Lucia Raymundo, a minha avó Helga Ilse Raymundo por serem exemplos de pessoas e sempre me apoiaram em todos os momentos. A minha irmã Margie e meu cunhado Uandro pela amizade e companheirismo.

Ao meu orientador e Prof. Dr. David Driemeier pelos ensinamentos, orientação e exemplo de grandes valores e humildade. E principalmente pela amizade construída ao longo destes anos.

Ao Professor Cláudio Estevão Farias da Cruz pela grande ajuda em todos os momentos, pela amizade, companheirismo e conselhos durante esta jornada.

Aos amigos que eu conheci e que me ajudaram a crescer na patologia e também como pessoa, Sandra Traverso, Edson Colodel, Professor Cláudio Barros e o pessoal da Patologia de Santa Maria, Professor Aldo Gava e pessoal da Patologia de Lages. Pedro Bezerra e Família.

Aos colegas do Setor de Patologia Veterinária Paulo, André (Uruguaio), Adriana, Juliano (Ogro), Fabiana, Nádia, Eduardo, Luciana, Danilo, Saulo, Tatiane, Luiz, Karine, Verônica, Felipe, Ana Paula, Paula, Marcele e Gabriel, Vacaria, Mauro Borba, Anderson, Pri. Por todos os momentos juntos.

Aos funcionários Ângela e Marília (Gurias) e Bárbara pela grande ajuda e amizade.

Aos colegas que me ajudaram durante o doutorado. Do Laboratório de Doenças Infeciosas – UNESP-Araçatuba Rafael, Rose e Professor Iveraldo pela oportunidade de acompanhar os trabalhos com *Clostridium botulinum* e pelo processamento de amostras enviadas. Do LANAGRO, Minas Gerais, Ronnie e Rogerio pelo processamento de amostras enviadas e disponibilidade de trabalho. Às colegas Raquel e Maria do Carmo do Zoológico de Sapucaia do Sul pelo material encaminhado e correções do artigo. Ao Professor Marcos Gomes e colegas do Laboratório de Bacteriologia da UFRGS pelo processamento bacteriológico de amostras.

A minha esposa Kiyoko pelo carinho, amor, apoio e confiança em todo esse período que estamos juntos.

ESTUDO COMPARATIVO DAS CLOSTRIDIOSES DIAGNOSTICADAS NO SETOR DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Djeison Lutier Raymundo

Orientador: David Driemeier

RESUMO

Descreve-se os achados epidemiológicos e clínico-patológicos das clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período 1996-março/2010. Este estudo incluiu uma pesquisa retrospectiva nos arquivos do SPV e uma etapa prospectiva, a qual também teve o objetivo de desenvolver exames complementares específicos para cada clostridiose. As clostridioses mais prevalentes foram tétano (em equinos, bovinos, ovinos e caprinos), botulismo (em bovinos, suínos e aves) e enterotoxemia (em caprinos). Também houve casos de edema maligno em equinos, bem como de carbúnculo sintomático e hemoglobinúria em bovinos. Adicionalmente, foram coletadas amostras de soro sanguíneo de animais afetados por tétano, em diferentes estágios de evolução da doença, para subsequente inoculação em camundongos (testes de bioensaio) e comprovação da técnica no diagnóstico da enfermidade.

Palavras-chave: Clostridioses, botulismo, tétano, enterotoxemia, carbúnculo sintomático, hemoglobinúria bacilar, edema maligno, animais domésticos e silvestres..

¹ Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias - Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, (77p.). Maio de 2010.

COMPARATIVE STUDY OF CLOSTRIDIAL DIAGNOSING IN SECTOR OF VETERINARY PATHOLOGY OF THE FEDERAL UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL¹

Author: Djeison Lutier Raymundo

Adviser: David Driemeier

ABSTRACT

This study describes the epidemiological and clinicopathological findings of clostridial diseases diagnosed in the 1996-March, 2010 period in the Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV_UFRGS). A retrospective survey in the files of SPV was complemented with a prospective phase, which also aimed developing complementary diagnostic tests of clostridiosis. The most prevalent clostridiosis were tetanus (in horses, cattle, sheep and goats), botulism (in cattle, pigs and birds), and enterotoxemia in goats. There also were cases of malignant edema in horses, blackleg and bacillary hemoglobinuria in cattle. In addition, blood serum samples from animals affected by tetanus on different stages of the disease evolution were applied in mice bioassay, as a complementary diagnosing test for the disease..

Keywords: *Clostridium* sp., botulism, tetanus, enterotoxaemia, blackleg, bacillary hemoglobinuria, malignant oedema, domestic and wild animals.

¹ PhD Tesis in Veterinary Sciences - Veterinary Pathology, Federal University of the Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, (77p.). May, 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	13
2.1. Clostridium sp.	13
2.2. Clostridioses de interesse em Medicina Veterinária	13
2.2.1. Tétano (<i>Clostridium tetani</i>).....	13
2.2.2. Botulismo (<i>Clostridium botulinum</i>)	14
2.2.3. Enterotoxemia (<i>Clostridium perfringens</i> tipo D).....	16
2.2.4. Carbúnculo sintomático (<i>Clostridium chauvoei</i>)	17
2.2.5. Hemoglobínúria bacilar (<i>Clostridium haemolyticum</i>).....	18
2.2.6. Edema maligno, gangrena gasosa ou miosite necrótica (<i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium novy</i> ou <i>Clostridium sordelli</i>)	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Estudo restrospectivo	21
3.2. Estudo prospectivo	21
3.3. Implementação e avaliação da técnica de bioensaio em camundongos para o diagnóstico de tétano.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Tétano (<i>Clostridium tetani</i>).....	26
4.2. Botulismo (<i>Clostridium botulinum</i>)	33
4.3. Enterotoxemia (<i>Clostridium perfringens</i> tipo D).....	39
4.4. Carbúnculo sintomático (<i>Clostridium chauvoei</i>)	41
4.5. Hemoglobínúria bacilar (<i>Clostridium haemolyticum</i>).....	43
4.6. Edema maligno ou miosite necrótica (<i>Clostridium septicum</i>)	46
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	47
ANEXO A	57
ANEXO B.....	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Distribuição dos casos de Clostridioses em bovinos, equinos, caprinos e ovinos diagnosticados no período de janeiro de 1996 a dezembro de 1997..... **25**
- Tabela 2** – Resultados do teste de bioensaio em camundongos com amostras de soro sanguíneo obtidas de bovinos com tétano. Identificação das amostras, identificação da propriedade, origem das amostras (fase da doença do bovino), dose inoculada, início dos sinais e resultado do teste de bioensaio..... **31**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição dos Casos de Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) entre o período de janeiro de 1996 e março de 2010. 23
- Figura 2** – Casos de tétano necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) nas diferentes espécies durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010. 26
- Figura 3** – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Equino com sinal clínico de tétano. Prolapso da 3ª pálpebra. 27
- Figura 4** – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Animal em estação com membros torácicos afastados (posição de cavalete). 28
- Figura 5** – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Expressão alerta, com olhos arregalados, orelhas eretas e a base da cauda erguida. 28
- Figura 6** – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Decúbito lateral permanente, membros estendidos, notando rigidez muscular e opistótono. 29
- Figura 7** – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com tétano. Tecido subcutâneo e musculatura de região da tábua do pescoço com hemorragia e grande quantidade de edema. 30
- Figura 8** – Teste de bioensaio em camundongo para tétano. Sinais clínicos em um camundongo que recebeu inoculação intramuscular de soro sanguíneo de bovino com tétano. Paralisia espástica de membros pélvicos e abdômen retraído denotando dificuldade respiratória. 32
- Figura 9** – Resultado dos testes de bioensaio em camundongos de acordo com a fase clínica dos bovinos com tétano. 32

Figura 10 – Distribuição dos casos de botulismo nas diferentes espécies, diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010.	33
Figura 11 – Restos de comida proveniente de sobras de restaurante armazenado sem proteção do tempo e animais. No detalhe alimento fornecido aos bovinos que estava contaminado com a toxina do <i>Clostridium botulinum</i>	34
Figura 12 – Massa de soja fornecida aos bovinos como alimento, em condições diversas de armazenamento, contaminada com a toxina do <i>Clostridium botulinum</i>	34
Figura 13 – Armazenamento dos restos de comida em tonéis metálicos ou plásticos, sem abrigo do sol e em condições sanitárias e higiênicas precárias. Detalhe: Restos de comida proveniente de sobras de restaurante fornecido aos suínos como alimento e contaminado com a toxina do <i>Clostridium botulinum</i>	35
Figura 14 – Distribuição dos surtos de botulismo em bovinos, suínos e aves com relação às estações do ano.	36
Figura 15 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de botulismo. Fraqueza de membros anteriores e posteriores com dificuldade de permanecer em estação.	37
Figura 16 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de botulismo. Protusão da língua devido à diminuição do tônus da musculatura.	37
Figura 17 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino afetado por botulismo. Decúbito lateral devido à paralisia flácida dos músculos.	38
Figura 18 – Distribuição dos casos de enterotoxemia diagnosticados em caprinos no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010.	39
Figura 19 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de caprino com enterotoxemia. Parte do cólon espiral com coloração vermelha difusa na serosa.	40
Figura 20 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de caprino	

	com enterotoxemia. Cólon espiral com conteúdo líquido avermelhado, restos necróticos e flocos de fibrina.	40
Figura 21	– Distribuição dos casos de carbúnculo sintomático diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS) entre o período de janeiro de 1996 e março de 2010.	41
Figura 22	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com carbúnculo sintomático. Tecido subcutâneo dos membros torácicos e pélvicos aumentados de volume, com áreas de hemorragia, enfisema e edema de líquido sero-sanguinolento.	42
Figura 23	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com carbúnculo sintomático. Histologia do músculo esquelético. Miosite necrótica com hemorragia, edema e áreas de enfisema. HE, obj 10.	43
Figura 24	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com hemoglobinúria bacilar. Bexiga com urina de coloração vermelho escura.	44
Figura 25	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado com grande área de infarto anêmico e trombos vasculares.	44
Figura 26	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado. Áreas de infarto e trombo vascular. HE, imagem sub-macroscópica.	45
Figura 27	– Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado. Focos de infarto com necrose de coagulação. HE, obj 10.	45

1. INTRODUÇÃO

As clostridioses incluem várias espécies de *Clostridium* que, acometem diversas espécies animais, tanto de produção, quanto selvagens. Nos animais de interesse pecuário, os clostrídios são extremamente importantes, pois atuam como agentes primários das doenças (Radostits *et al.*, 2007). Muitos clostrídios são patogênicos e produzem toxinas que atuam de maneiras distintas. Essas toxinas podem ser produzidas e absorvidas na luz intestinal (enterotoxemia - *Clostridium perfringens*), produzidas em focos de necrose tecidual (tétano - *Clostridium tetani*, carbúnculo sintomático - *Clostridium chauvoei*, hemoglobinúria bacilar - *Clostridium haemolyticum* e edema maligno - *Clostridium* sp.) ou ainda, produzidas em alimentos ou matéria orgânica animal e vegetal em decomposição e ingeridas pré-formadas (botulismo - *Clostridium botulinum*) (COETZER; TUSTIN, 2004).

Este trabalho incluiu um estudo comparativo das clostridioses que ocasionaram a morte de animais necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) o período de 1996 à março/2010. Nesse estudo, a epidemiologia, sinais clínicos, alterações macro e microscópicas de doenças como tétano (*Clostridium tetani*), botulismo (*C. botulinum*), hemoglobinúria bacilar (*C. haemolyticum*), carbúnculo sintomático (*C. chauvoei*), edema maligno (*C. septicum*, *C. novy* ou *C. sordelli*) e enterotoxemia (*C. perfringens*) foram analisadas. Adicionalmente foi desenvolvida e avaliada a técnica de bioensaio em camundongo para o tétano, como técnica de diagnóstico complementar da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. *Clostridium* sp.

As clostridioses são causadas por bactérias anaeróbicas, mais precisamente, bacilos gram-positivos formadores de esporos. Diversas espécies do gênero *Clostridium* sp. são comprovadamente patogênicas e têm capacidade de produzir toxinas que atuam de maneiras distintas. Essas toxinas podem ser produzidas e absorvidas na luz intestinal (enterotoxemia – *Clostridium perfringens*), produzidas em focos de necrose tecidual (tétano – *C. tetani*, carbúnculo sintomático – *C. chauvoei*, hemoglobinúria bacilar – *C. haemolyticum* e edema maligno – *Clostridium* sp.), ou ainda, produzidas em alimentos ou matéria orgânica animal e vegetal em decomposição e ingeridas pré-formadas (botulismo – *Clostridium botulinum*) (COETZER; TUSTIN, 2004).

Em todas as clostridioses, a morbidade em um surto é variável, mas a letalidade fica próxima a 100% (FERREIRA *et al.*, 2008). O botulismo é uma das três maiores causas de perdas em rebanhos bovinos no Brasil e as demais clostridioses têm grande importância em determinadas regiões. Em conjunto, essas doenças são responsáveis por consideráveis perdas econômicas na criação de animais em todo o Brasil (FERREIRA *et al.*, 2008).

2.2. Clostridioses de interesse em Medicina Veterinária

2.2.1. Tétano (*Clostridium tetani*)

Tétano é causado por toxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*. Os esporos estão presentes no solo, poeira e fezes de animais (WILKENS *et al.*, 1988). Todas as espécies animais são suscetíveis à doença; no entanto, algumas espécies são mais suscetíveis que outras. Os animais mais sensíveis às toxinas tetânicas são os equinos, ovinos e caprinos. Os animais menos sensíveis são os camundongos, coelhos, cães, gatos, suínos e bovinos. As aves são as mais resistentes à doença (SMITH; WILLIAMS *et al.*, 1984).

A bactéria é introduzida nos tecidos através de feridas como as produzidas na utilização de agulhas contaminadas, corte de cauda, castração, tosquia e fraturas, entre

outras (DRIEMEIER, *et al.* 2007). O *C. tetani* não é uma bactéria invasiva e permanece no local de entrada. Há produção de uma toxina que causa necrose tecidual local, o que favorece a anaerobiose e facilita a proliferação bacteriana com a produção de neurotoxinas (COETZER; TUSTIN, 2004), as quais podem atingir o sistema nervoso central por três vias distintas, corrente linfática, sanguínea, ou retrocesso pela inervação periférica (WOOLCOCK *et al.*, 1979; SCHWAB *et al.*, 1979).

O período de incubação varia de três dias a três semanas, pois depende de fatores como a quantidade de neurotoxina formada, a toxigenicidade da cepa, a quantidade de toxina circulante ou ligada a neurônios (COETZER; TUSTIN, 2004; WOOLCOCK *et al.*, 1979). Os sinais clínicos se caracterizam por rigidez progressiva da musculatura voluntária com espasmos tetânicos, que são agravados ou muitas vezes desencadeados por estímulos externos como sons ou toque. Também pode ser observado o prolapso da 3ª pálpebra, trismo mandibular e espasmos da cauda, além de rigidez e hiperestesia dos membros. Após o início dos sinais clínicos, a evolução é bastante rápida e em um período de 12 a 72 horas ocorre a morte (RAMSAY, 1973).

O diagnóstico se baseia nos sinais clínicos e dados epidemiológicos, visto que na macro e microscopia geralmente não são encontradas alterações. Porém, em alguns casos pode-se observar a ferida onde a bactéria se desenvolveu, pois há edema e hemorragia subcutâneas e muscular. (COETZER; TUSTIN, 2004; NAKAZATO *et al.*, 1998, RAPOSO, 2007; TIMONEY *et al.*, 1988). O isolamento bacteriano do agente é difícil, mas pode auxiliar no diagnóstico (RAPOSO, 2007). O diagnóstico pode ser confirmado pela demonstração da toxina em tecidos e líquidos animais; para tanto utiliza-se o soro de animais afetados em estágios iniciais da doença. Tal prática não é muito utilizada (BISPING; AMTSBERG, 1988).

2.2.2. Botulismo (*Clostridium botulinum*)

Botulismo é causado pela ingestão da toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, bacilo Gram-positivo encontrado no solo, água e trato digestivo dos animais (DUTRA *et al.*, 1993). Sob condições de anaerobiose, os esporos do *C. botulinum* proliferam e produzem as neurotoxinas que são classificadas em 7 diferentes tipos (A, B, C, D, E, F e G) (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). As toxinas C e D causam

botulismo em bovinos, ovinos e equinos; enquanto as aves domésticas e silvestres são afetadas pela toxina C (LANGENEGGER *et al.*, 1983). As toxinas atuam nas junções neuromusculares, onde provocam paralisia flácida muscular (LISBOA *et al.*, 1996).

Os surtos de botulismo em bovinos ocorrem principalmente de duas formas diferentes. A mais freqüente no Brasil pode ser associada à deficiência de fósforo e osteofagia (carcaças de animais presentes nos campos) em bovinos, ovinos e caprinos criados extensivamente (LANGENEGGER; DOBEREINER 1988; COETZER; TUSTIN, 2004). A outra forma acomete principalmente bovinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos e é associada à ingestão da toxina presente em alimentos ou água, além de resultar em alta mortalidade de animais em um curto espaço de tempo (COETZER; TUSTIN, 2004). Essa forma também ocorre no Brasil, principalmente associada à ingestão de água e de cama de frango contaminados com carcaças (DUTRA *et al.*, 2001; ORTOLANI *et al.*, 1997), ou quando há contaminação de silagem, alfafa, milho e restos de comida provenientes de restaurantes (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

O curso clínico da doença é variável de acordo com a quantidade de toxina ingerida. Na maioria dos casos, a doença apresenta uma evolução aguda com sinais que se desenvolvem entre 1 e 17 dias (ORTOLANI *et al.*, 1997). A doença se caracteriza por paralisia flácida dos músculos da locomoção, mastigação, deglutição e respiração. Inicialmente há paresia e paralisia dos membros pélvicos, com evolução para os torácicos e, posteriormente, pescoço e cabeça. Os animais apresentam andar cambaleante e rígido. Durante todo o período clínico, os animais se mantêm alertas e se alimentam normalmente. Em casos mais avançados, os animais permanecem em decúbito, podem apresentar paralisia de língua e significativa dificuldade respiratória, evidentemente na forma abdominal e bifásica (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Nenhuma lesão significativa é observada na macro ou microscopia. No entanto em alguns casos podem ser encontrados pedaços de osso no conteúdo ruminal (ORTOLANI *et al.*, 1997).

O diagnóstico se baseia nos sinais clínicos associados com a epidemiologia e ausência de lesões na necropsia e histologia (LANGENEGGER; DOBEREINER 1988). A confirmação laboratorial é feita pela técnica do ensaio biológico em camundongo (inoculação intraperitoneal de extrato hepático, conteúdo ruminal e intestinal de animais afetados), considerado o teste mais específico para a doença, mas que apresenta

sensibilidade próxima de 43% (DUTRA *et al.*, 2001). O diagnóstico pode ser realizado também pela técnica de microfixação do (DUTRA *et al.*, 1993), e ensaio imunoenzimático (ELISA), em que se observou resultados semelhantes ao ensaio biológico (SILVA *et al.*, 1991).

2.2.3. Enterotoxemia (*Clostridium perfringens* tipo D)

Enterotoxemia é o termo usado para descrever doenças causadas por toxinas produzidas no trato gastrintestinal, principalmente, por *Clostridium perfringens* (BUXTON; DONACHIE 1991). Os diferentes tipos de *C. perfringens* são classificados como A, B, C, D ou E em relação à variação na produção de quatro diferentes toxinas principais (alfa, beta, épsilon e iota). *C. perfringens* tipo D é a causa mais comum da enterotoxemia em ovinos e caprinos (MCDONEL, 1980; COETZER; TUSTIN, 2004; UZAL; KELLY, 1996; VAN METRE *et al.*, 2000), além de ser a única forma descrita no Brasil (RIET-CORREA *et al.*, 1983, RIET-CORREA, 2007c).

O *C. perfringens* é habitante normal do intestino de ruminantes saudáveis (VAN METRE *et al.* 2000) e, quando fatores como níveis elevados de carboidratos, dietas ricas em proteína, ou diminuição do trânsito intestinal alteram o ambiente intestinal, criam-se condições ideais para o crescimento da bactéria e produção da toxina épsilon (COETZER; TUSTIN, 2004) que é a principal responsável pelo quadro clínico e lesões da enterotoxemia em caprinos (MCDONEL, 1980).

São afetados cordeiros de 3 a 10 semanas bem alimentados e em pastagens de boa qualidade (WILLIAMS, 1966). A evolução é muito rápida, geralmente em menos de 2 horas e raramente passa de 12 horas (RADOSTITS *et al.*, 2007). Experimentalmente, observam-se sinais nervosos de depressão, opistótono, movimentos de pedalagem, coma e morte (RIET-CORREA, 2007).

Em caprinos, a doença pode afetar animais de todas as idades (COLODEL *et al.*, 2003) e também ocorre de forma aguda. Os animais apresentam cólicas abdominais, diarreia hemorrágica, sonolência, depressão e perda de apetite. Mais próximo à morte esses animais apresentam transtornos neurológicos como ataxia progressiva, decúbito, convulsões, salivação e opistótono, além de estertores pulmonares (RIET-CORREA, 2007c).

Durante a necropsia de ovinos com enterotoxemia se observa bom estado corporal. Em jovens, os rins podem estar amolecidos e há líquidos cavitários ou hemorragias nas serosas. Em alguns casos também se observa avermelhamento de segmentos do intestino delgado (RIET-CORREA, 2007c). Em caprinos as serosas do cólon e ceco estão avermelhadas e pode haver edema de parede intestinal. O conteúdo intestinal é líquido verde-escuro ou avermelhado com filamentos de fibrina (RIET-CORREA, 2007c; COETZER; TUSTIN, 2004).

Na histologia observa-se na região do tronco encefálico de ovinos, uma área focal de malácia bilateral e simétrica acompanhada por hemorragia e edema perivasculares (BUXTON; LINKLATER; DYSON, 1978). Tais lesões são raras em caprinos com enterotoxemia (RIET-CORREA, 2007c).

O diagnóstico presuntivo de enterotoxemia pode ser feito pela observação da ocorrência de morte de animais que são alimentados com altos níveis de concentrado. As lesões hemorrágicas do intestino observadas durante a necropsia e as lesões histológicas quando presentes no sistema nervoso central são características da doença (RIET-CORREA, 2007c). O diagnóstico definitivo é obtido com a detecção da toxina épsilon no conteúdo intestinal. (HORNITSKY *et al.*, 1989; RIET-CORREA, 2007c).

2.2.4. Carbúnculo sintomático (*Clostridium chauvoei*)

Carbúnculo sintomático é causado pelo *Clostridium chauvoei*, que também pode estar associado à ocorrência de edema maligno em bovinos, ovinos e caprinos (COETZER; TUSTIN, 2004; REBHUN *et al.*, 1985). O carbúnculo sintomático acomete bovinos com até 2 anos de idade e se apresenta de forma sazonal, quando a maioria dos casos ocorre durante o verão e outono (RIET-CORREA, 2007a; COETZER; TUSTIN, 2004). Os surtos ocorrem mais em determinadas regiões do que em outras, as quais aparentemente são livres da doença (HENNING apud COETZER; TUSTIN, 2004).

Os esporos do *C. chauvoei* presentes no solo e na água são ingeridos, atravessam a luz intestinal chegam no sangue e se distribuem para os tecidos, principalmente, musculatura esquelética, onde permanecem de forma latente por longos períodos (KERRY, 1964). Acredita-se que, sob condições favoráveis de anaerobiose, como ocorre

em traumatismos ou vacinas, há multiplicação do *C. chauvoei* produção da toxina e gás (HATHAWAY, 1990).

O curso da doença é muito rápido, geralmente menos de 24 horas. Muitas vezes não são observados sinais antes da morte (SIPPEL, 1972). Quando observados, os sinais clínicos se caracterizam por elevação da temperatura corporal, depressão, anorexia e claudicação severa. As regiões dos músculos afetados estão aumentadas de volume com crepitação (RIET-CORREA, 2007a).

Após a morte, os animais entram em putrefação rapidamente (RIET-CORREA, 2007a; COETZER; TUSTIN, 2004). Quando a lesão se localiza nos músculos dos membros, observa-se aumento de volume com crepitação. Ao corte o tecido subcutâneo e músculos apresentam líquido sero-sanguinolento, bolhas de gás e odor característico de manteiga rançosa (HENNING apud COETZER; TUSTIN, 2004). Histologicamente, o músculo afetado apresenta necrose, hemorragia, bactérias e bolhas de gás (MCGAVIN, ZACHARY, 2007).

O histórico e epidemiologia (morte súbita de animais com menos de 2 anos de idade) sugerem a ocorrência do carbúnculo sintomático. O aumento de volume muscular com crepitação e as alterações de necropsia são achados característicos da doença. O isolamento da bactéria confirma o diagnóstico (RIET-CORREA, 2007a); entretanto, também é possível a confirmação através do teste imuno-histoquímico de tecidos em parafina (Assis *et al.* 2005).

2.2.5. Hemoglobinúria bacilar (*Clostridium haemolyticum*)

Hemoglobinúria bacilar é causada pelo *Clostridium haemolyticum* (*Clostridium novy* tipo D). A doença acomete principalmente bovinos, mas também ovinos, equinos e suínos (COETZER; TUSTIN, 2004). Ocorre em zonas úmidas e alagadiças, onde o agente infeccioso está presente. Nessas regiões, a migração de *Fasciola* sp. causa lesões no fígado que criam ambientes propícios de anaerobiose para que os esporos latentes germinem e produzam a toxina que causa a lesão (ERWIN, 1977). Essa toxina aumenta a área de necrose no fígado e permite a proliferação bacteriana, além de causar hemólise intravascular, anemia e hemoglobinúria (COETZER; TUSTIN, 2004, HATHAWAY, 1990).

Os sinais clínicos se desenvolvem muito rapidamente e, muitas vezes, não são observados. Quando vistos, há febre, icterícia, fezes enegrecidas e hemoglobinúria (RIET-CORREA, 2007d).

Na necropsia os cadáveres estão em bom estado corporal, com icterícia generalizada, líquido sero-sanguinolento nas cavidades e urina vermelho escura. O fígado apresenta um ou mais focos com até 20 cm de diâmetro, de coloração esbranquiçada e circundado por área hiperêmica (RIET-CORREA, 2007d).

Histologicamente, o fígado apresenta áreas de necrose de coagulação circundada por hemorragia e infiltrado polimorfonuclear. No interior da lesão observa-se inúmeros bacilos Gram-positivos compatíveis com *Clostridium* sp. (RIET-CORREA, 2007d).

O diagnóstico se baseia nos dados do histórico clínico e epidemiologia. Os achados de necropsia são muito importantes para o diagnóstico, pois as áreas de necrose no fígado são características da doença (RIET-CORREA, 2007d). O diagnóstico laboratorial pode ser feito por determinação da toxina, uma vez que o isolamento do agente exige meios de cultivo específicos (HATHAWAY, 1990).

2.2.6. Edema maligno, gangrena gasosa ou miosite necrótica (*Clostridium septicum*, *Clostridium novy* ou *Clostridium sordelli*)

Edema maligno, também chamado de gangrena gasosa, ou miosite por clostrídios (PEEK *et al.*, 2003) é uma infecção aguda determinada pela contaminação de ferimentos por bactérias do gênero *Clostridium*, como *C. septicum*, *C. novy* ou *C. sordelli* (RADOSTITS *et al.*, 2007). Além desses, menos frequentemente também podem causar a doença *C. perfringens* (JEANES *et al.* 2001) e *C. chauvoei* (HAGEMOSER *et al.* 1980). Animais de todas as idades são afetados e, geralmente, ocorrem casos isolados, mas surtos podem estar associados com problemas de manejo como castração, tosquia, corte de cauda, injeções, ferimentos relacionados ao parto, feridas penetrantes e traumatismos diversos (RADOSTITS *et al.* 2007, RIET-CORREA, 2007b). Edema maligno é frequentemente observado em bovinos, ovinos e caprinos que são espécies mais suscetíveis; enquanto suínos e equinos tem susceptibilidade menor (COETZER; TUSTIN, 2004).

Os animais acometidos por edema maligno apresentam evolução aguda e morte em 24-48 horas após a entrada do agente (RIET-CORREA, 2007b; JEANES *et al.*, 2001). Os animais apresentam febre, depressão, toxemia e inchaço da musculatura com crepitação e edema (RIET-CORREA, 2007b). A lesão muscular inicialmente é hiperêmica, quente, macia e delimitada; posteriormente se torna escura, fria, firme e necrótica (REED, 1955; REBHUN *et al.*, 1985). A palpação do local afetado revela acúmulo de gás no tecido subcutâneo e músculos adjacentes (PERDRIZET *et al.*, 1987; JEANES *et al.*, 2001).

Na necropsia observa-se, em alguns casos, grande quantidade de líquido inflamatório sero-sanguinolento subcutâneo. Em outros, há grande quantidade de gás subcutâneo e nas fáscias musculares, mas não se observa lesões (RIET-CORREA, 2007b). Entretanto, quando a musculatura está afetada, pode ser observada severa miosite necrótica (COETZER; TUSTIN, 2004).

O diagnóstico se baseia no histórico, sinais clínicos e lesões de necropsia (RIET-CORREA, 2007b; COETZER; TUSTIN, 2004). O agente pode ser identificado por isolamento, imunofluorescência e imuno-histoquímica (RADOSTITS *et al.* 2007; RIET-CORREA, 2007b), confirmando o diagnóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo retrospectivo

Foi realizado um estudo retrospectivo nos arquivos do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) à procura dos casos de clostridioses diagnosticados no período de janeiro de 1996 à fevereiro de 2008. Foram resgatados os dados epidemiológicos, achados de necropsia e histopatologia de cada caso, presentes nos protocolos de necropsia.

3.2. Estudo prospectivo

Durante o período de março de 2008 a março de 2010 foram necropsiados e estudados no SPV-UFRGS, casos de clostridioses provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) e de estabelecimentos visitados com suspeita de mortes por clostridiose. Dados referentes ao histórico clínico e epidemiológico dos animais foram também obtidos com proprietários e veterinários. Sempre que possível, os sinais clínicos apresentados pelos animais enfermos foram acompanhados em visitas às propriedades ou pelo envio desses animais ainda vivos ao SPV-UFRGS para a realização de eutanásia e necropsia.

Durante as necropsias foram coletadas amostras de vísceras refrigeradas para a análise bacteriológica, pesquisa de toxinas e teste de bioensaio em camundongos. Foram coletadas, também, amostras de vísceras que foram fixadas em solução de formalina tamponada 10% por 24-48 horas e subsequentemente desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (ALLEN, 1992) e quando necessário, corados por técnicas especiais para bactérias como o método de Gram e a impregnação pela prata de Warthin-Starry.

De acordo com a suspeita, amostras de conteúdo ruminal ou gástrico, conteúdo intestinal e porções do fígado de bovinos e suínos foram coletadas, armazenadas e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas – UNESP-Araçatuba, para o

teste de bioensaio em camundongos e detecção da toxina botulínica. Amostras de conteúdo intestinal, fígado e soro sanguíneo de aves foram coletadas, armazenadas e encaminhadas ao LANAGRO de Minas Gerais para o teste de bioensaio em camundongos e detecção da toxina botulínica. Amostras de conteúdo intestinal (intestino delgado, ceco e cólon) foram coletadas e encaminhadas ao LANAGRO de Minas Gerais para a pesquisa da toxina épsilon produzidas por *C. perfringens*. Soro sanguíneo e líquido de edema das feridas de animais foram utilizados para realização do teste de bioensaio em camundongos para toxina tetânica e encaminhados para cultura bacteriana do agente. Amostras de fígado, músculo esquelético e líquido de edema foram coletados para isolamento bacteriano de *C. haemolyticum* e *C. chauvoei*, respectivamente.

3.3. Implementação e avaliação da técnica de bioensaio em camundongos para o diagnóstico de tétano

Foram utilizados para o teste de bioensaio em camundongos, o soro de animais afetados por tétano e o líquido de edema presentes nas feridas de inoculação da bactéria de animais que morreram pela enfermidade. As amostras de soro foram separadas em três grupos quanto à fase de evolução da doença: inicial (com sinais leves, em estação e andar rígido), final (inaptos à locomoção, decúbito esternal ou lateral, dispnéia) e animais mortos durante surtos de tétano. Esses testes com material de animais doentes serviu para avaliar a eficácia do teste de bioensaio em camundongos como diagnóstico complementar de tétano.

O material do soro sanguíneo foi inoculado por via intramuscular nos membros pélvicos dos camundongos. Cada amostra coletada era inoculada em dois camundongos em quantidades de 0,5 e 1,0 mL, respectivamente. Os animais eram mantidos em caixas com maravalha, água e ração por período de 15 dias e acompanhados diariamente quanto à evolução dos sinais clínicos.

4. RESULTADOS

Durante o período de janeiro/1996 a março/2010 de um total de 4.109 necropsias realizadas em diferentes espécies animais 142 (3,46%) tiveram o diagnóstico de clostridiose. As espécies animais afetadas foram bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos, suínos e aves. As clostridioses mais prevalentes foram tétano (55/142), botulismo (47/142) e enterotoxemia (30/142). Outras clostridioses menos freqüentes incluíram carbúnculo sintomático em bovinos (6/142) e miosite por *Clostridium septicum* em eqüinos e hemoglobínúria bacilar em bovinos (2/142). (Figura 1).

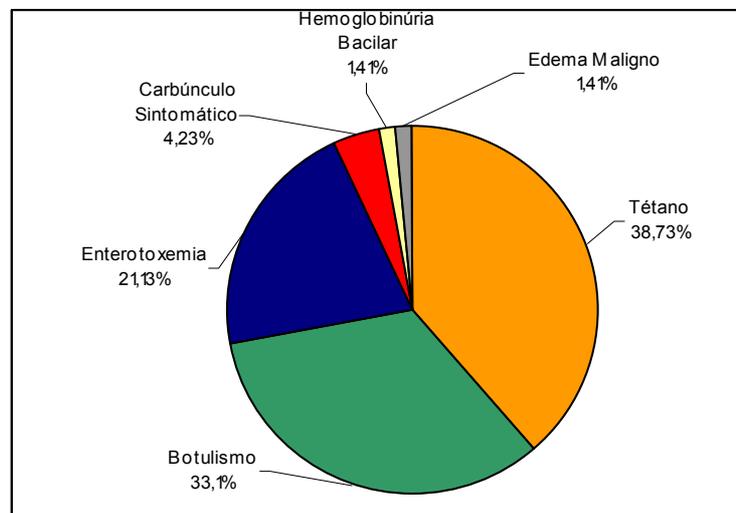


Figura 1 – Distribuição dos Casos de Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) entre o período de janeiro de 1996 e março de 2010.

No período analisado foram necropsiados 920 (22,39%) bovinos, dos quais 5,76% (53/920) foram acometidos por clostridioses que incluíram tétano 43,4% (23/53), botulismo 41,51% (22/53), carbúnculo sintomático 11,32% (6/53) e hemoglobínúria bacilar 3,77% (2/53). As necropsias em eqüinos somaram 457 (11,12%), das quais as clostridioses foram identificadas em 5,25% (24/457) e incluíram tétano com 91,67% (22/24) e a miosite necrótica por *C. septicum* 8,33% (2/24). As necropsias de caprinos totalizaram 335 (8,15%) e em 9,25% (31/335) dessas se identificou clostridioses representadas por enterotoxemia 96,77% (30/31) e um caso de tétano 3,23% (1/31). Ovinos totalizaram 336 necropsias (8,18%) e as clostridioses estiveram implicadas em

2,68% (9/336) dessas, o tétano foi a única clostridiose confirmada nessa espécie. Suínos totalizaram 1823 necropsias (44,37%) no período e o botulismo foi a única clostridiose confirmada e acometeu 0,66% (12/1823) dos casos observados no período. No mesmo período, foram realizadas 238 (5,79%) necropsias de aves. O botulismo foi a única clostridiose confirmada na espécie e acometeu 5,46% (13/238) dos casos. A doença foi observada em diferentes espécies de aves, como em Cisne-de-Pescoço-Preto (*Cygnus melancoryphus*) (4/13), Galinha Doméstica (*Gallus gallus*) (4/13), Cisne Negro (*Cygnus atratus*) (3/13), Pato-do-Mato (*Cairina moschata*) (1/13) e Pomba Doméstica (*Columba livia*) (1/13). A distribuição dos casos de clostridioses em cada espécie é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos casos de Clostridioses em bovinos, equinos, caprinos e ovinos diagnosticados no período de janeiro de 1996 a dezembro de 1997.

Clostridioses	Bovinos		Equinos		Caprinos		Ovinos		Suínos		Aves		TOTAL
	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	
Tétano	23	43,4%	22	91,67%	1	3,23%	9	100%	0	0	0	0	55
Botulismo	22	41,51%	0	0	0	0	0	0	12	100%	13	100%	47
Enterotoxemia	0	0	0	0	30	96,77%	0	0	0	0	0	0	30
Carbúnculo Sintomático	6	11,32%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Hemoglobinúria Bacilar	2	3,77%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Miosite Necrótica por <i>Clostridium septicum</i>	0	0	2	8,33%	0	0	0	0	0	0	0	0	2
TOTAL	53		24		31		9		12		13		142

4.1. Tétano (*Clostridium tetani*)

No período do estudo foram necropsiados no SPV-UFRGS 55 animais com tétano que representam 1,34% do total de necropsias e 38,73% das clostridioses. Dos casos de tétano observados, 23 ocorreram em bovinos (41,82%), 22 em equinos (40%), 9 em ovinos (16,36%) e um caso em caprino (1,82%). A mortalidade nos surtos variou entre um e 100 animais. A distribuição dos casos de tétano de acordo com as espécies afetadas e anos de ocorrência estão representadas nas Figura 2.

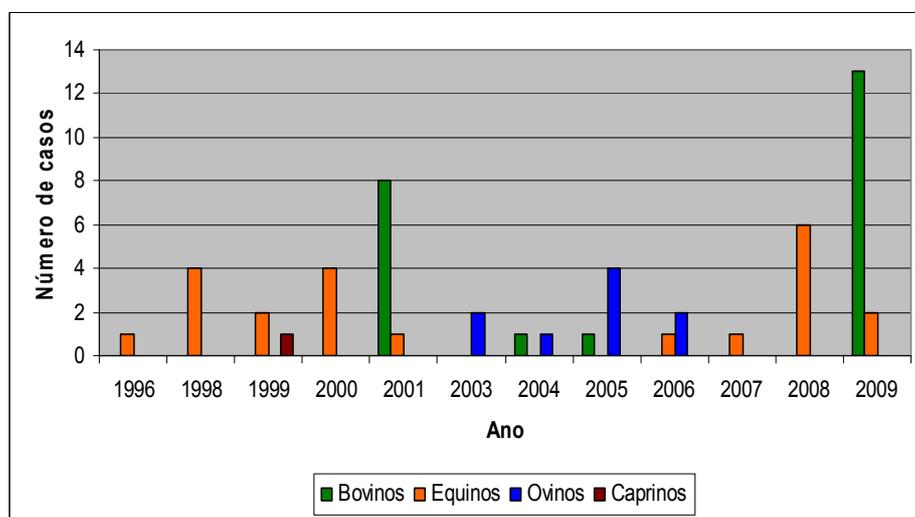


Figura 2 – Casos de tétano necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) nas diferentes espécies durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010.

Em equinos, entre as causas responsáveis pela lesão que serviu como porta de entrada para o agente, destaca-se as lesões perfurantes, fraturas de membros e problemas associados com a coloração de ferraduras. No entanto, na maioria dos equinos não se localizou a porta de entrada da bactéria. O período de incubação do agente, quando calculado, variou de cinco dias a alguns meses; enquanto que o período de evolução após o início dos sinais clínicos variou de três dias a duas semanas. Os equinos apresentavam sinais de dificuldade de alimentação, de micção, defecação e, algumas vezes cólica. Muitas vezes apresentavam dificuldade de locomoção e, quando em movimento, andar rígido, além de rigidez da musculatura dos membros e pescoço. Posteriormente, esses animais entravam em decúbito permanente diversas vezes associado com trismo

mandibular, prolapso da 3ª pálpebra (Figura 3) e tetraparesia espástica dos membros que, na maioria das vezes, progredia para a morte por parada respiratória.



Figura 3 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Equino com sinal clínico de tétano. Prolapso da 3ª pálpebra.

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos afetados estão relacionados com duas formas distintas de contaminação, um caso em que o animal foi fistulado para fins científicos e houve contaminação da ferida cirúrgica. Todos os demais estão ligados à aplicação de medicamentos e ocorreram na forma de surtos em grande número de animais em várias propriedades. Nesses casos, os bovinos apresentaram sinais clínicos cerca de 10 a 20 dias após aplicação de vacinas e medicamentos, os animais permaneceram doentes por 24-48 horas antes da morte. Os bovinos apresentavam rigidez muscular que manifestava-se nos membros pélvicos e depois se tornava generalizada. E esses animais apresentavam andar rígido e, quando em estação, adotavam posição de cavalete (Figura 4). Os bovinos apresentavam expressão alerta com olhos arregalados, orelhas eretas e base da cauda levantada (Figura 5). Nistagmo e prolapso da 3ª pálpebra também foram observados. Posteriormente, esses bovinos apresentavam decúbito lateral permanente, espasmos tetânicos com opistótono (Figura 6) e respiração abdominal. Alguns desses bovinos foram tratados com penicilina e soro antitetânico, mas todos os animais afetados morreram.



Figura 4 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Animal em estação com membros torácicos afastados (posição de cavalete).



Figura 5 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Expressão alerta, com olhos arregalados, orelhas eretas e a base da cauda erguida.



Figura 6 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de tétano. Decúbito lateral permanente, membros estendidos, notando rigidez muscular e opistótono.

Os sinais clínicos apresentados por ovinos e caprinos incluíram enrijecimento da musculatura dos membros que inicialmente afetavam os membros torácicos e evoluíam para os pélvicos. Posteriormente os animais permaneciam em decúbito lateral com trismo mandibular, sialorréia e opistótono. Nesses animais a doença foi sempre associada com colocação de brincos ou apara de cascos, cerca de 15 dias antes do início dos sinais clínicos. Durante as necropsias, poucas alterações significativas foram observadas nos diferentes órgãos, exceto na área de entrada e proliferação do agente, quando encontrada. No tecido subcutâneo e musculatura adjacente a essas áreas havia extensa necrose, hemorragia e edema. Em eqüinos, muitas vezes não se podia observar a lesão proveniente da proliferação da bactéria, mas se observava palidez, necrose e ruptura de alguns músculos. Nos bovinos essas lesões foram na maioria das vezes, compostas por áreas de granuloma com edema, hemorragia e necrose observados na região do pescoço (Figura 7) ou até a cernelha ou escapula.



Figura 7 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com tétano. Tecido subcutâneo e musculatura de região da tábua do pescoço com hemorragia e grande quantidade de edema.

Microscopicamente, observou-se no local da ferida grande quantidade de hemorragia e edema entre as fibras musculares, áreas de necrose muscular associada à infiltração de neutrófilos e eventualmente aglomerados bacterianos de bacilos Gram-positivos com esporos terminais e morfologia compatível com *C. tetani*.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do bioensaio realizado em camundongos utilizando soro de bovinos nas três fases de evolução do tétano. O teste foi positivo em 60% dos diagnósticos realizados (12/20). Os camundongos apresentaram sinais clínicos de paralisia espástica dos membros pélvicos e dificuldade respiratória (Figura 8) e morte. O teste de bioensaio foi positivo com soro de bovinos na fase inicial da doença em 85,7% (6/7) das inoculações, da fase final em 42,9% (3/7) dos ensaios e, de animais mortos em 50% (3/6). Na figura 9, é ilustrado o resultados dos testes de bioensaio realizados. As amostras provenientes de líquido de edema não obtiveram resultados satisfatórios em testes de bioensaio realizados em camundongos.

Tabela 2 – Resultados do teste de bioensaio em camundongos com amostras de soro sanguíneo obtidas de bovinos com tétano. Identificação das amostras, identificação da propriedade, origem das amostras (fase da doença do bovino), dose inoculada, início dos sinais e resultado do teste de bioensaio.

Bovino	Identificação	Fase da Doença	Doses*	Início de Sinais de Tétano após a Inoculação	Resultado do Bioensaio
1	Propriedade 1	Inicial	0,5 e 1,0 mL	3 dias	Positivo
2	Propriedade 2	Morto	0,5 e 1,0 mL	5 dias	Positivo
3	Propriedade 2	Final	0,5 e 1,0 mL	NDS**	Negativo
4	Propriedade 3	Final	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
5	Propriedade 3	Final	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
6	Propriedade 3	Final	0,5 e 1,0 mL	NDS	Negativo
7	Propriedade 3	Inicial	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
8	Propriedade 4	Inicial	0,5 e 1,0 mL	5 dias	Positivo
9	Propriedade 5	Inicial	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
10	Propriedade 6	Final	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
11	Propriedade 6	Inicial	0,5 e 1,0 mL	1 dia	Positivo
12	Propriedade 7	Morto	1,0 mL	NDS	Negativo
13	Propriedade 7	Final	0,5 e 1,0 mL	NDS	Negativo
14	Propriedade 8	Final	0,5 e 1,0 mL	NDS	Negativo
15	Propriedade 8	Morto	0,5 e 1,0 mL	5 dias	Positivo
16	Propriedade 8	Morto	0,5 e 1,0 mL	5 dias	Positivo
17	Propriedade 9	Morto	1,0 mL	NDS	Negativo
18	Propriedade 9	Inicial	1,0 mL	NDS	Negativo
19	Propriedade 9	Inicial	1,0 mL	7 dias	Positivo
20	Propriedade 10	Morto	0,5 e 1,0 mL	NDS	Negativo

* Cada valor da dose corresponde a uma inoculação em um camundongo diferente.

** NDS: Não desenvolveu sinais clínicos.



Figura 8 – Teste de bioensaio em camundongo para tétano. Sinais clínicos em um camundongo que recebeu inoculação intramuscular de soro sanguíneo de bovino com tétano. Paralisia espástica de membros pélvicos e abdômen retraído denotando dificuldade respiratória.

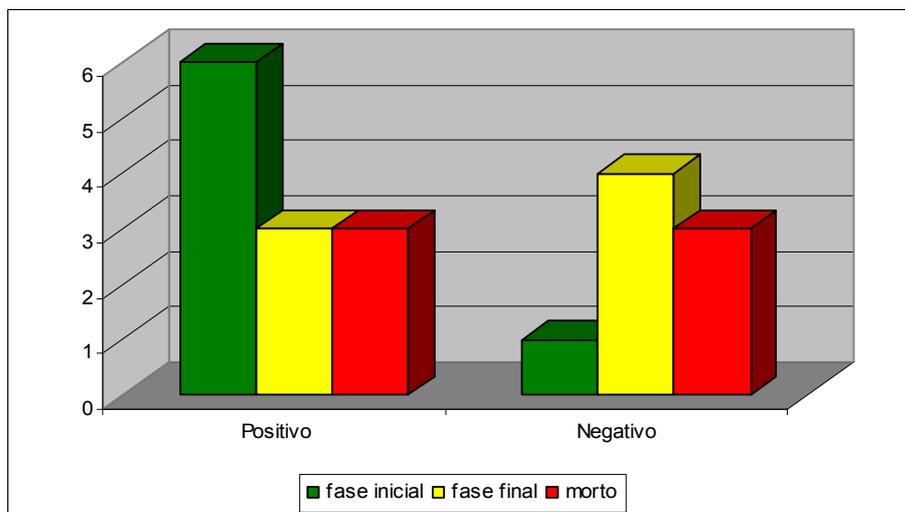


Figura 9 – Resultado dos testes de bioensaio em camundongos de acordo com a fase clínica dos bovinos com tétano.

4.2. Botulismo (*Clostridium botulinum*)

No período de estudo foram necropsiados 47 animais mortos por botulismo no SPV-UFRGS que representam 1,14% do total de necropsias realizadas e 33,1% dos casos de clostridioses. Dos casos de botulismo, 22 ocorreram em bovinos (46,81%), 13 em aves (27,66%) e 12 em suínos (25,53%). A mortalidade nos surtos variou entre um e 30 animais. A distribuição dos diversos casos de botulismo em bovinos, suínos e aves no período estudado está representada na Figura 10.

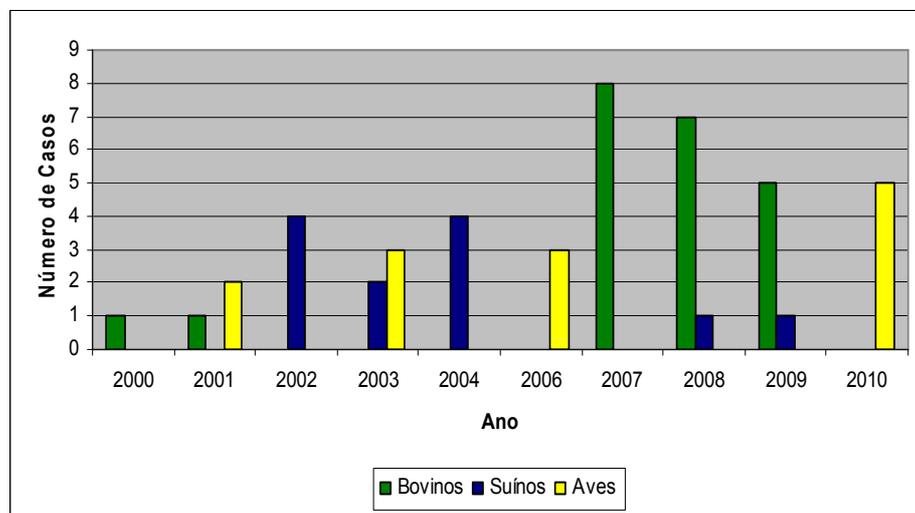


Figura 10 – Distribuição dos casos de botulismo nas diferentes espécies, diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010.

As origens de contaminação com toxinas botulínicas identificadas em bovinos incluíram osteofagia, restos de comida de restaurante contaminados (Figura 11) e massa de soja contaminada (Figura 12).



Figura 11 – Restos de comida proveniente de sobras de restaurante armazenado sem proteção do tempo e animais. No detalhe alimento fornecido aos bovinos que estava contaminado com a toxina do *Clostridium botulinum*.



Figura 12 – Massa de soja fornecida aos bovinos como alimento, em condições diversas de armazenamento, contaminada com a toxina do *Clostridium botulinum*.

Todos os suínos acometidos foram alimentados com restos comida de restaurantes. Nas propriedades, os restos de comida eram armazenados em tonéis metálicos ou plásticos, sem coberturas (Figura 13). Esse alimento era administrado aos

suínos uma vez ao dia em cochos coletivos sem cozimento prévio. A alimentação dos animais era complementada com ração comercial.



Figura 13 – Armazenamento dos restos de comida em tonéis metálicos ou plásticos, sem abrigo do sol e em condições sanitárias e higiênicas precárias. Detalhe: Restos de comida proveniente de sobras de restaurante fornecido aos suínos como alimento e contaminado com a toxina do *Clostridium botulinum*.

Exceto por dois surtos ocorridos em animais selvagens de criatórios, não se esclareceu a origem da contaminação em casos de botulismo em aves. As fontes de ingestão das toxinas botulínicas detectadas nos recintos das aves silvestres mantidas em cativeiro incluíram carcaças de aves em decomposição infestadas por larvas de moscas e áreas rasas ou com formação de lodo nas beiras dos açudes associadas com altas temperaturas durante o verão e acúmulo de matéria orgânica em decomposição, promovendo ambientes em anaerobiose propícios para o desenvolvimento e produção de toxina. Os surtos de botulismo em bovinos, suínos e aves foram observados nas épocas mais quente do ano, durante o verão, final da primavera e início do outono, conforme se observa na Figura 14.

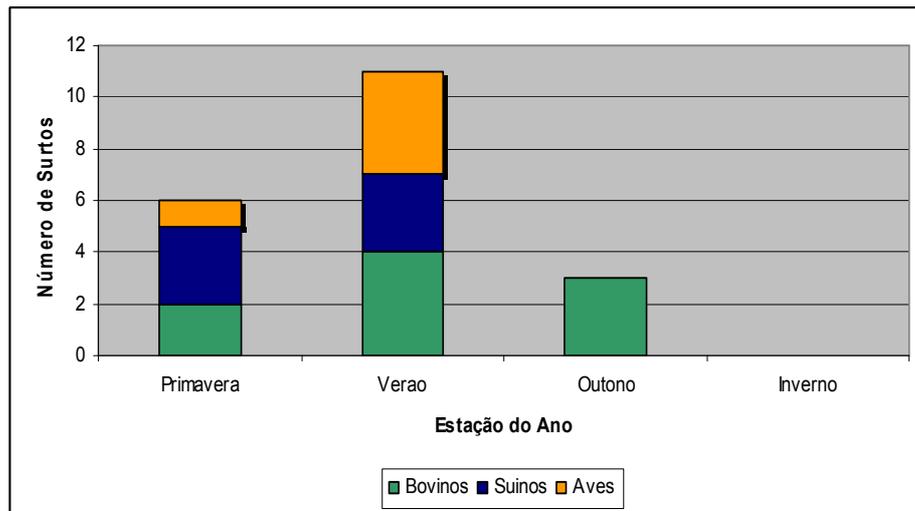


Figura 14 – Distribuição dos surtos de botulismo em bovinos, suínos e aves com relação às estações do ano.

Clinicamente os bovinos apresentavam cansaço e fraqueza de membros pélvicos que evoluía para os torácicos, dificuldade de locomoção e quedas (Figura 15) ao movimento. Posteriormente esses animais entravam em decúbito esternal, mas permaneciam alertas e se alimentavam e bebiam normalmente. Observava-se em alguns animais a diminuição do tônus da musculatura da língua (Figura 16), dificuldade de deglutição, dificuldade respiratória e paralisia flácida generalizada (Figura 17). Durante todo o curso clínico, os animais não apresentaram elevação da temperatura. Os principais sinais clínicos em suínos acometidos foi paralisia flácida, emagrecimento, anorexia, fraqueza, incoordenação, dificuldade de locomoção e evolução para decúbito lateral com micção e defecação involuntárias. Notou-se também vocalização intensa sempre que os animais eram estimulados a levantar, diminuição do consumo de água e alimento e, finalmente, morte. As aves afetadas clinicamente apresentavam sinais de paralisia flácida da musculatura esquelética caracterizada por dificuldade de movimentar as asas e de nadar, queda do pescoço, e dificuldade respiratória acentuada. Algumas aves apresentavam somente paralisia flácida ou, quando movimentadas, mostravam sinais exacerbados, inclusive culminando com a morte, em alguns casos.



Figura 15 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de botulismo. Fraqueza de membros anteriores e posteriores com dificuldade de permanecer em estação.



Figura 16 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com sinal clínico de botulismo. Protusão da língua devido à diminuição do tônus da musculatura.



Figura 17 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Bovino afetado por botulismo. Decúbito lateral devido à paralisia flácida dos músculos.

Na necropsia dos bovinos afetados por botulismo não foram encontradas alterações significativas. Na necropsia dos suínos os achados eram inespecíficos e se caracterizavam por ascite discreta, fígado com pontos brancos multifocais (migração parasitária) e linfonodos inguinais levemente aumentados. Na necropsia das aves, observou-se bom estado nutricional, fígado difusamente amarelado e hemorragias na forma de petéquias no epicárdio. Em todos os animais necropsiados, o pulmão apresentava-se difusamente vermelho-escuro e com líquido sanguinolento ao corte. No exame microscópico de todas as espécies não foram observadas alterações, exceto em bovinos, nos quais havia áreas de degeneração hialina em fibras musculares e, nas aves silvestres, foram observadas degeneração gordurosa no fígado e congestão pulmonar acentuada. Em todas as necropsias de bovinos foram coletadas vísceras para confirmação do diagnóstico clínico e todas as amostras o tiveram resultado negativo. Das amostras de alimento fornecido aos bovinos e suspeito de contaminação por toxina botulínica, apenas a amostra proveniente do surto onde os animais eram alimentados com restos de restaurante. Em dois surtos de botulismo em suínos e em um surto em aves silvestres em cativeiro, o teste do bioensaio com a soro neutralização obteve resultado positivo para a toxina botulínica do tipo C.

4.3 Enterotoxemia (*Clostridium perfringens* tipo D)

No período de estudo, houve 30 casos de enterotoxemia o que representou 0,73% do total de necropsias e 21,13% das clostridioses. Todos os casos afetaram a espécie caprina. A distribuição dos diversos casos de enterotoxemia em caprinos no período em questão está representada na Figura 18.

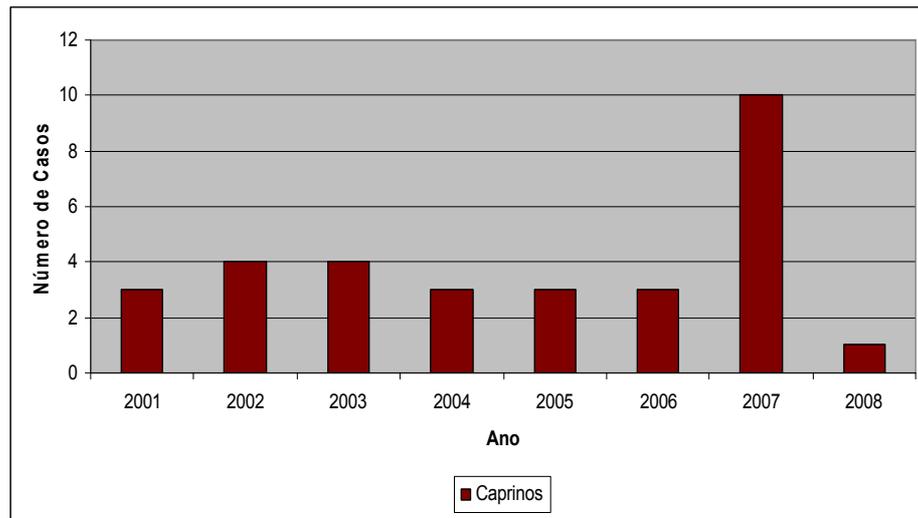


Figura 18 – Distribuição dos casos de enterotoxemia diagnosticados em caprinos no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) durante o período de janeiro de 1996 a março de 2010.

Todos os casos de enterotoxemia em caprinos estiveram associados com consumo de grandes quantidades de concentrado. A evolução clínica foi hiperaguda e fôrnos caprinos eram encontrados mortos. Em 13 casos o período de evolução era de cerca de 12 horas. Os caprinos apresentavam apatia, depressão, anorexia, perda de apetite e cólicas com contração da musculatura abdominal e gemidos. Também se observou diarreia líquida e profusa amarelada, verde-escura ou com conteúdo sanguinolento associado com muco e fibrina. Os caprinos necropsiados tinham estado corporal regular a bom, mas com variados graus de desidratação. À abertura da carcaça, observava-se coleção de líquidos nas cavidades torácica, abdominal e pericárdica, muitas vezes com filamentos de fibrina ou coágulos de proteína. As principais lesões eram observadas nas alças intestinais que se apresentavam distendidas e com conteúdo líquido na luz. No cólon e ceco, observou-se serosa avermelhada (Figura 19) e, algumas vezes, edema de mucosa. O conteúdo intestinal era líquido verde-escuro ou avermelhado, com restos necróticos e flocos de

fibrina (Figura 20) e, muitas vezes, formava moldes da luz intestinal. Os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de tamanho. No rúmen, havia acúmulo do alimento concentrado fornecido aos animais. Em alguns casos, o rim se apresentava avermelhado e com consistência diminuída e o pulmão também avermelhado com edema.



Figura 19 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de caprino com enterotoxemia. Parte do cólon espiral com coloração vermelha difusa na serosa.

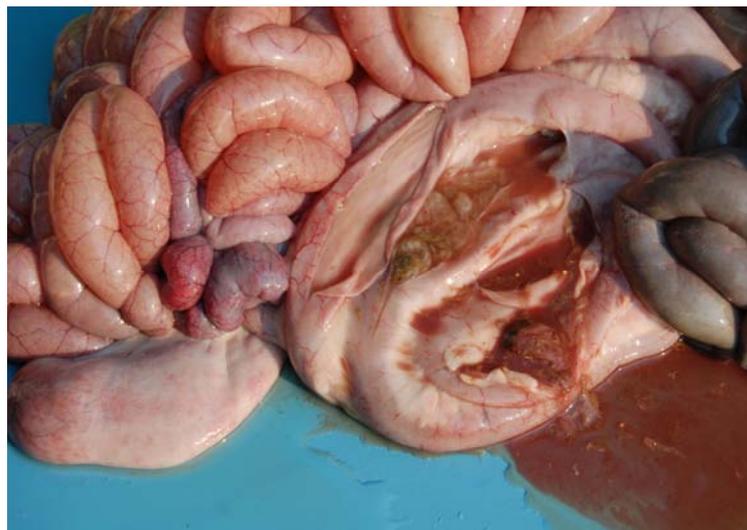


Figura 20 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de caprino com enterotoxemia. Cólon espiral com conteúdo líquido avermelhado, restos necróticos e flocos de fibrina.

Microscopicamente, a principal alteração era observada nos intestinos, principalmente cólon e ceco, onde havia enterite com deposição de fibrina e restos necróticos na mucosa, presença de bactérias entre a fibrina ou em colônias superficiais no epitélio associadas com congestão e hemorragias. Havia, também, infiltrado inflamatório mononuclear na submucosa e, em alguns casos, edema. O tecido linfoide, principalmente nas placas de Peyer do intestino delgado, baço e linfonodos, apresentava hiperplasia e necrose. Havia também, no rúmen, degeneração vacuolar, hiperplasia e hiperqueratose na mucosa. Os rins apresentavam a cortical amolecida com autólise. Em um caprino observou-se acúmulo de material eosinofílico hialino perivascular no tronco cerebral (núcleo caudato e tálamo). As amostras de conteúdo intestinal coletadas durante as necropsias dos caprinos demonstraram a presença da toxina épsilon produzida pelo *C. perfringens*.

4.4. Carbúnculo sintomático (*Clostridium chauvoei*)

No período estudado, houve 6 casos de carbúnculo sintomático que representaram 0,15% do total de necropsias e 4,23% dos casos de clostridioses. A distribuição desses casos de carbúnculo sintomático em bovinos está representada na Figura 21.

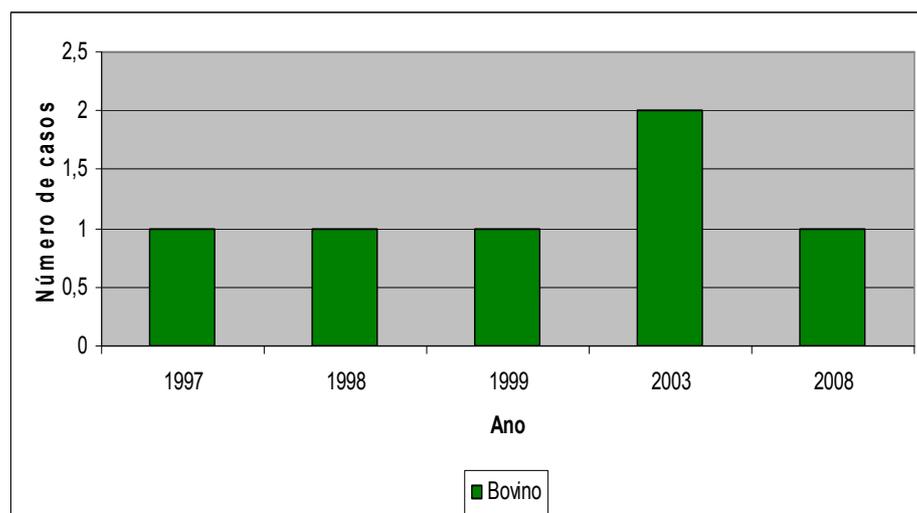


Figura 21 – Distribuição dos casos de carbúnculo sintomático diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) entre o período de janeiro de 1996 e março de 2010.

Em todos os casos, os animais afetados tinham idade entre 6 meses e 1,5 anos e não foram vacinados. Em alguns animais, não foram observados sinais clínicos, apenas encontrados mortos. Quando observados os sinais incluía claudicação, incoordenação, cólica e parada ruminal. Esses animais entravam em decúbito e apresentavam aumento de volume dos membros torácico e/ou pélvicos, com crepitação e ao corte, havia áreas de hemorragia, enfisema e edema sero-sanguinolento (Figura 22) nos tecidos subcutâneos e muscular. No pulmão e saco pericárdico, havia líquido sero-sanguinolento e no coração, pericardite e miocardite necrótica em um caso.



Figura 22 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com carbúnculo sintomático. Tecido subcutâneo dos membros torácicos e pélvicos aumentados de volume, com áreas de hemorragia, enfisema e edema de líquido sero-sanguinolento.

Na microscopia, observou-se miocardite fibrinopurulenta associada com bactérias e, no músculo esquelético, havia miosite necro-hemorrágica também associada com bactérias Gram-positivas e enfisema (Figura 23).

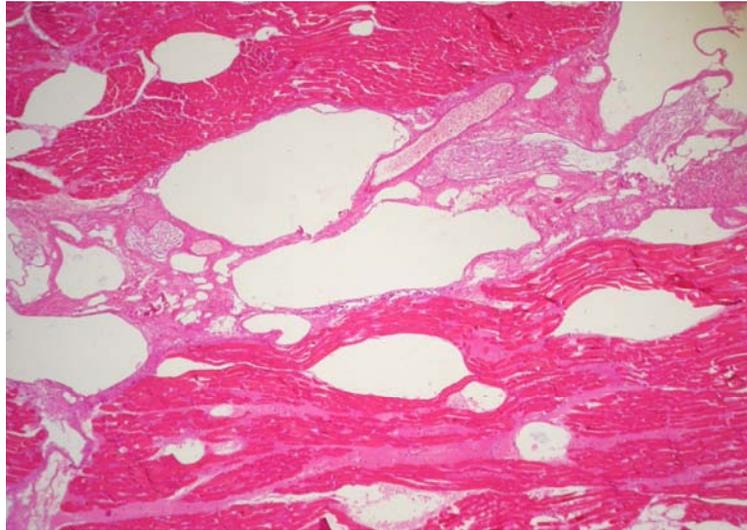


Figura 23 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com carbúnculo sintomático. Histologia do músculo esquelético. Miosite necrótica com hemorragia, edema e áreas de enfisema. HE, obj 10.

4.5. Hemoglobinúria bacilar (*Clostridium haemolyticum*)

No período estudado, houve 2 casos de hemoglobinúria bacilar em bovinos e que representaram 0,04% do total de necropsias e 1,41% das clostridioses. Os animais estavam em campos onde havia *Fasciola hepática*, permaneciam afastados do rebanho e tinham corrimento nasal e retal sanguinolento

Durante a necropsia, observou-se bom estado nutricional e congestão e icterícia de mucosas. Havia hemorragias no peritônio, pâncreas e duodeno. Também constatou-se grande quantidade de urina vermelho-escura na bexiga (Figura 24), rins vermelho-escuros e, no fígado, grande área de infarto anêmico associados com áreas menores de infarto e trombos vasculares (Figura 25).

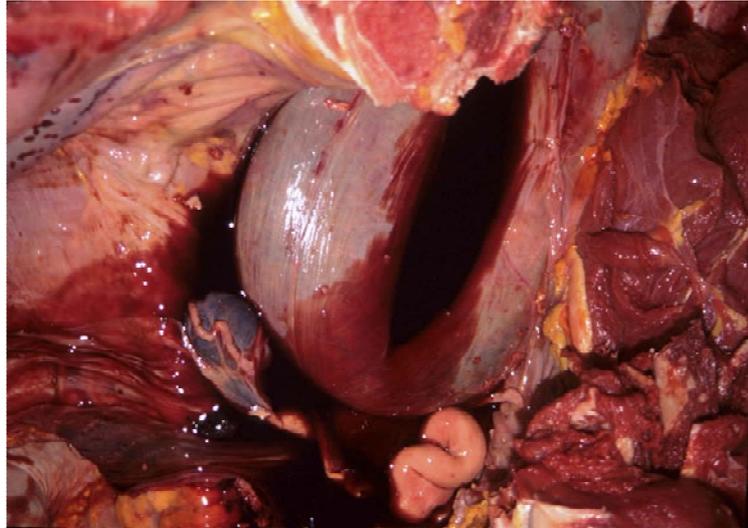


Figura 24 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com hemoglobinúria bacilar. Bexiga com urina de coloração vermelho escura.



Figura 25 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado com grande área de infarto anêmico e trombos vasculares.

Na histologia, essas áreas do fígado eram compostas por focos de necrose de coagulação associados com presença de bacilos Gram-positivos e circundados por um halo de hiperemia e inflamação, além de trombose em vasos adjacentes (Figuras 26 e 27). Nos rins, observaram-se cilindros de hemoglobina e proteína com formação de gotas

hialinas no epitélio tubular. No pulmão havia congestão, edema e hemorragia com de trombos de fibrina.

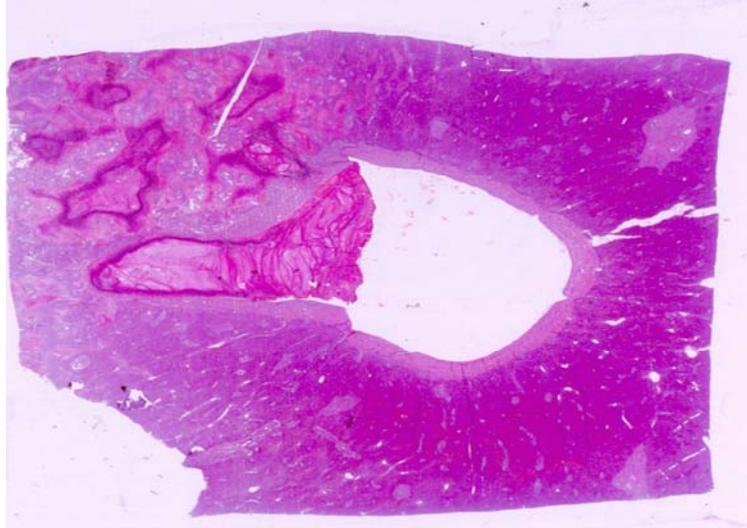


Figura 26 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado. Áreas de infarto e trombo vascular. HE, imagem sub-macroscópica.

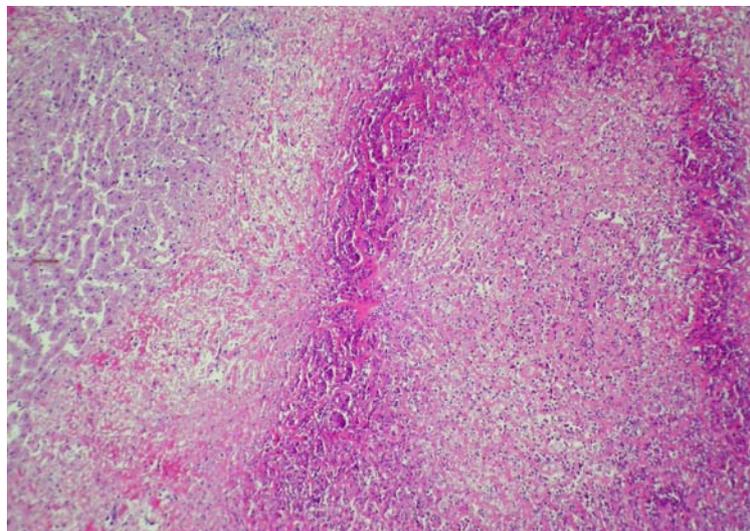


Figura 27 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grane do Sul (SPV-UFRGS). Bovino com hemoglobinúria bacilar. Fígado. Focos de infarto com necrose de coagulação. HE, obj 10.

4.6. Edema maligno ou miosite necrótica (*Clostridium septicum*)

No período 1996-março/2010 foram 2 casos de miosite necrótica que representaram 0,04% do total de necropsias e 1,41% das clostridioses. Os dois casos afetaram equinos e se isolou *C. septicum* do edema das lesões. Um dos equinos havia perdido uma ferradura e foi tratado com antiinflamatório intramuscular, o outro foi tratado para emagrecimento com antiparasitário e antiinflamatório intramusculares. Durante as necropsias, observou-se em ambos, aumento de volume do membro pélvico direito que se estendia para o abdômen ventral. Ao toque, tais aumentos eram crepitantes e tinham edema depressível (sinal de godê). Ao corte dessa áreas, havia edema sanguinolento e bolhas de gás subcutâneo e intramuscular. Os músculos esqueléticos estavam com áreas vermelho-escuras e edema sanguinolento, crepitantes e, ao corte, apresentavam aspecto seco. No equino 1, esta alteração foi observada nos músculos grácil, semi-membranáceo, glúteo bíceps, quadríceps femoral e glúteo superficial. No equino 2, os músculos afetados eram glúteo superficial, glúteo acessório, glúteo médio, grácil e quadríceps femoral. No coração de ambos os equinos observaram-se petéquias na superfície epicárdica e no equino 2, líquido serosanguinolento no saco pericárdico. O pulmão apresentava-se congesto, com edema e petéquias subpleurais nos dois animais. Ao exame histopatológico, ambos equinos, tinham graus variáveis de tumefação e vacuolização de fibras, além de numerosos segmentos de fibras com necrose hialina e flocular nos músculos esqueléticos. Entre as fibras musculares, havia edema e hemorragia, grande quantidade de bacilos Gram-positivos com dimensões de 3-6 μm associados com áreas de enfisema com infiltrado de neutrófilos e monócitos. Na pele, havia congestão difusa acentuada, edema, hemorragia e enfisema com grande número de bacilos. Através de técnicas de colorações especiais foi possível evidenciar grandes bacilos nas áreas de necrose. Pela técnica de coloração de Gram, esses bacilos eram roxos, coloração característica de bactérias gram-positivas. Na técnica de impregnação pela prata (Warthin-Starry), esses bacilos se apresentaram enegrecidos. No material encaminhado para exame microbiológico, observou-se em coloração direta do músculo, grande quantidade de células vegetativas, algumas esporuladas, compatíveis com *Clostridium* sp. Não houve qualquer crescimento em aerobiose; entretanto, após 48 horas, em ambiente anaeróbico, foi observado crescimento de incontáveis colônias β -hemolíticas com coloração branco-acizentadas, bordos irregulares e crescimento em ondas características do *C. septicum*.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De todas as clostridioses diagnosticadas no SPV-UFRGS, no período 1996-2010, as mais importantes foram tétano, botulismo e enterotoxemia. Tétano e botulismo causaram mais de 70% dos casos observados. Em bovinos, as doenças mais importantes foram o tétano e o botulismo que perfizeram mais de 80% das clostridioses. Em equinos e ovinos, a clostridiose mais importante foi tétano e representou mais de 90% e 75% dos casos, respectivamente. Em caprinos, a enterotoxemia foi a principal clostridiose e foi associada com mais de 95% dos casos. Em suínos e aves, a única clostridiose diagnosticada foi botulismo. Os casos observados de tétano demonstraram que a doença não foi muito frequente em ovinos e caprinos, sabidamente sensíveis à toxina tetânica (ODENDAAL & KRIEK, 2004). Tal fato pode estar associado com menor número de solicitação diagnósticas por veterinários que definem o diagnóstico pelos sinais clínicos e epidemiologia sem encaminhar animais para diagnóstico pós-morte. Em equinos, os casos de tétano foram observados em grande número e distribuídos ao longo dos anos. Como é demonstrado na literatura, pois é a espécie mais sensível à toxina tetânica (ODENDAAL & KRIEK, 2004; RADOSTITS *et al.*, 2007). Em bovinos, a doença foi observada com maior intensidade em 2001 e 2009, na forma de grandes surtos que acometeram muitos animais em diversas propriedades e em diferentes regiões e, portanto, com indícios de fonte de contágio comum. Em 2001 os surtos de tétano em bovinos foram associados à contaminação do *C. tetani* em frascos de vermífugo (DRIEMEIER *et al.*, 2007). Pela epidemiologia dos surtos acompanhados em 2009 acredita-se que a mesma forma de disseminação do *C. tetani*, com contaminação de algum medicamento possa ter ocorrido e propiciado a ocorrência dos surtos. O teste de bioensaio em camundongos como complemento para o diagnóstico clínico de tétano em bovinos obteve resultados satisfatórios. Comparando-se as três fases de amostragens coletadas, os testes de inoculação com amostras de animais em fase inicial da doença apresentaram sensibilidade maior em comparação com as inoculações de amostras de animais em fase final da doença ou mortos. Assim, aparentemente, quanto mais precoce for realizada a coleta de material para ensaio biológico em camundongo, maior será a chance de acerto no teste. Maior número de testes devem ser feitos para avaliar corretamente a eficácia e precisão dos testes de bioensaio em camundongos e para que se tenha certeza de que é um método confiável de confirmar a doença em complemento do diagnóstico clínico de tétano.

A maioria dos casos de botulismo do Brasil esta relacionada à deficiência mineral e ingestão de ossos e restos de carcaças presentes nos campos (LANGENEGGER; DOBEREINER 1988), entretanto nos casos acompanhados aqui, praticamente todos os casos estiveram associados com contaminação dos alimentos. O teste de bioensaio realizado em laboratórios especializados revelou, em sua maioria, resultados negativos, tanto no alimento contaminado, quanto nas amostras dos animais doentes. O diagnóstico de botulismo nesses casos se baseou principalmente no histórico e alterações clínicas observados nos surtos em associação com a exclusão de outras doenças (FERNANDES & RIET-CORREA, 2007). Surtos de botulismo em suínos estiveram exclusivamente ligados ao fornecimento de sobras de alimento proveniente de restaurantes. Através do teste do bioensaio e soroneutralização em camundongo foi possível comprovar a maioria das intoxicações na espécie e inclusive determinar a toxina botulínica do tipo C como a responsável nesses casos. Em suínos, a intoxicação pela toxina botulínica é rara e, quando ocorre está associada com a toxina do tipo C. Exemplos de fontes de ingestão dessa toxina são de restos de alimento em decomposição (DOIURTRE, 1967). Na maioria dos casos de botulismo em aves não se determinou a fonte da intoxicação, entretanto nos dois surtos ocorridos em aves silvestres mantidas em cativeiro as duas possíveis causas de fonte de contaminação presentes nos recintos das aves são descritas como as principais formas de intoxicação em aves aquáticas (ROCKE & BOLLINGER 2007; DUNCAN & JENSEN 1976). Através do teste de bioensaio em camundongo foi possível isolar a toxina botulínica tipo C em amostras de um dos surtos. Em todos os surtos de botulismo em bovinos, suínos e aves, os casos se concentraram nas épocas mais quentes do ano. Sugere-se, então que a elevação da temperatura nessas épocas aliada às condições ideais de anaerobiose possa ter propiciado a proliferação bacteriana e a produção da toxina. Pelo que se observou nesses casos de botulismo em bovinos, há necessidade de que se desenvolva nova técnica diagnóstica alternativa para o ensaio biológico, pois este tem identificado apenas 43,1% dos casos clínicos (BARROS et al., 2006). Neste estudo, apenas uma amostra proveniente de material coletado em surto de botulismo bovino obteve resultado positivo. Os casos de enterotoxemia foram observados em caprinos e distribuídos de forma uniforme ao longo dos anos, o que identifica a doença como frequente e importante na espécie. O histórico observado em quase todos os casos estava ligado ao consumo de grandes quantidades de alimentos concentrados. As alterações patológicas foram diarreia com conteúdo sanguinolento e acúmulo de fibrina na luz. Na maioria dos casos, a detecção da toxina épsilon presente no conteúdo intestinal dos

caprinos doentes confirmou o diagnóstico. Assim como descrito por KRIEK, ODENDAAL & HUNTER (2004), o diagnóstico nesses casos foi realizado com base no histórico, achados clínicos e patológicos, além de ser confirmado pela detecção da toxina no conteúdo intestinal. Os casos de carbúnculo sintomático observados apresentaram epidemiologia muito semelhante ao usualmente descrito, contudo os ocorreram em número muito abaixo do esperado, especialmente porque esta é considerada uma das principais doenças infecciosas do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA, 2007a; FERREIRA *et al.*, 2008). Os dois casos de hemoglobinúria bacilar observados ocorreram em áreas baixas e alagadiças, portanto confirmam o que é citado pela literatura. A doença aparentemente tem pouca importância, pois a casuística foi muito baixa e se apresentou de forma esporádica. Os dois casos de edema maligno em equino foram esporádicos e associados com contaminação durante a aplicação de medicamentos, o que demonstra seu envolvimento com problemas de manejo. Em ruminantes, porém não foram observados casos da doença no SPV-UFRGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T. C. Hematoxylin and Eosin. In: PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. et al. (Eds.) **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 53-58. 1992.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R.; SANTOS, R.L.; DIAS, G.R.C.; NASCIMENTO, A.P.; ABREU, V.L.V.; PARREIRAS, P.M.; UZAL, F.A. Immunohistochemical detection of Clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, pp. 4-8. 2005
- BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. ed. São Paulo: AGNS gráfica e editora. pp.57-62. cap.57. 2006.
- BISPING, W.; AMTSBERG, G. **Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals**. pp.94-95. 1988.
- BUXTON D. e DONACHIE, W. Clostridial diseases. In: MARTIN W.B. & AITKEN I.D. (ed.) **Diseases of Sheep**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 2nd ed., 1991, p. 104-114.
- BUXTON, D.; LINKLATER, K.A.; DYSON, D.A. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. **Veterinary Record**. v.102, p.241. 1978.
- COETZER, J.A.W. e TUSTIN, R.C. Endospore-Forming Gram-Positive rods and cocci. In: __. **Infectious Diseases of Livestock**. Cape Town: Oxford University Press, 2nd ed., 2004, v.3, cap.176-180, p.1787-1902.
- COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; SCHMITZ, M.; GERMER, R.A.P.; NASCIMENTO, R.A.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; UZAL, F.A. Enterotoxemia

em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.23, 173-178. 2003.

DOIURTRE, M.P. Botulism in animals in Senegal. **Bulletin / Office International des Epizooties**. 67:1497. 1967.

DRIEMEIER, D.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, J.C.T.; COLODEL, E.M.; CORRÊA, A.M.R.; CRUZ, C.E.F.; BARROS, C.S.L. Outbreaks of Tetanus in Beef Cattle and Sheep in Brazil Associated with Disophenol Injection. **Journal of Veterinary Medicine Series A**. v.54, n.6, p.333-335, 2007.

DUTRA, I.S.; WEISS, H.E.; WEISS, H.; DOBEREINER, J. Diagnóstico de botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.13, p.83-86, 1993.

DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; ROSA, I.V. et al. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, p.43-48, 2001.

ERWIN, B.G. Experimental induction of bacillary hemoglobinúria in cattle. **American Journal of Veterinary Research**. v.38, p.1625-1627. 1977.

FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Botulismo. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. et al. (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.1, cap.3, p. 215-224.

FERREIRA, J.L.M.; LADEIRA, S.R.L.; RUAS, J.L. *et al.* **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária UFPEL, n.28. 2008.

- HAGEMOSER, W.A.; HOFFMAN, L.J.; LUNDVALL, R.L. *Clostridium chavoiei* infection in a horse. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.176, p.631-633. 1980.
- HATHAWAY, C.H.L. Toxigenic Clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**. v.1, p.66-98, 1990.
- HORNITSKY, M.; ROMALIS, L.F.; ROSS, A.D.; SHELDRAKE, R.F. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with mouse protection assay in the detection of epsilon toxin in the intestinal contents of goats. **Australian Veterinary Journal**. v.66, p.121-122. 1989.
- JEANES, L.V.; MAGDESIAN, K.G.; MADIGAN, J.E.; MEAGHER, D. Clostridial myonecrosis in horses. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.23, n.6, p.577-587. 2001.
- KERRY, J.B. A note on the occurrence of *Clostridium chauvoei* in the livers and spleens of normal cattle. **Veterinary Record**. v.76, p.396. 1964.
- KRIEK N.P.J.; ODENDAAL M.W. & HUNTER, P. *Clostridium perfringens* type D infections, p.1846-1855. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press, Cape Town. v.3. cap.180, 2nd ed., 2004.
- LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. Botulismo epizootico em bovinos no Brasil. **Agroquímica**, n.20, 22-26, 1983.
- LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.8, p.37-42, 1988.

- LISBOA, J.A.; KUCHENBUCK, M.R.G.; DUTRA, I.S. et al. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.16, p.67-74, 1996.
- MCDONEL J.L.; MORGAN, K.T. Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by . **Pharmacology Ther.** v.10, n.3, p.617-655. 1980.
- MCDONEL J.L. *Clostridium perfringens* (type A, B, C, D, E). **Pharmacology Ther.** v.10, n.3, p.617-655. 1980.
- MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4 ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier. pp.1476. 2007.
- NAKAZATO, L.; BRUM, K.B. Tétano. In: LEMOS, R.A.A. (ed). **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. P. 142-144. 1998.
- ODENDAAL M.W. & KRIEK N.P.J. 2004. *Clostridium septicum* infections, p.1869-1873. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), **Infectious Diseases of Livestock**. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- ORTOLANI, E.L.; BRITO, L.A.B.; SATSUKI, C. et al. Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three brazilian cattle herds. **Veterinary and Human Toxicology**. v.39, p.89-92, 1997.
- PEEK, S.F.; SEMRAD, S.D.; PERKINS, G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985–2000). **Equine Veterinary Journal**. v.35, n.1, p.86-92. 2003.

- PERDRIZET, J.A.; CALLIHAN, D.R.; REBHUN, W.C.; SHIN, S.J. Successful management of malignant edema caused by *Clostridium septicum* in a horse. **Cornell Veterinarian**. v.77, n.4, p.328-338. 1987.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with bacteria – II. In: ____, **Veterinary Medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier. pp. 830-832. 2007.
- RAMSAY, W.R. An outbreak of tetanus-like disease in cattle. **Australian Veterinary Journal**. v.49, p.188-189. 1973.
- RAPOSO, J.B. Tétano. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.N.; LEMOS, R.A.A. et al. (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.1, cap.3, p. 425-432.
- REBHUN, W.C.; SHIN, S.J.; KING, J.M.; BAUM, K.H.; PATTEN V. Malignant edema in horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.187, n.7, p.732-736. 1985.
- REED, C.H. Malignant edema infection in a horse. **California Veterinary**. v.8, p.30-33. 1955.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; OLIVEIRA, J.A.; TURNES, G.; GONÇALVES, A. **Atividades do Laboratório regional de Diagnóstico e doenças da área de influência no período 1978-1982**. Pelotas: Editora Universitária. p.98. 1983.
- RIET-CORREA, F. Carbúnculo Sintomático. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. et al. (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, 2007a. v.1, cap.3, p. 264-267.

- RIET-CORREA, F. Edema Maligno. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. *et al.* (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3^a ed. Santa Maria: Pallotti, 2007b. v.1, cap.3, p. 286-288.
- RIET-CORREA, F. Enterotoxemia e Necrose simétrica focal. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. *et al.* (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3^a ed. Santa Maria: Pallotti, 2007c. v.1, cap.3, p. 288-293.
- SCHILD, A.L. Hemoglobínúria Bacilar. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. *et al.* (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3^a ed. Santa Maria: Pallotti, 2007d. v.1, cap.3, p. 305-308.
- SCHWAB, M.E., SUDA, E., THOENEN, H. Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. **The Journal of Cell Biology**. v.82, pp.798-810, 1979.
- SILVA, D.A.O.; SOUSA, M.A.; BEICHER, A.M.A.H.; MINEO, J.R.; FERREIRA, F.A.; COELHO, H.E.; BASTOS, J.E.D. Ensaio imunoenzimático (Elisa) para detecção de toxina botulínica tipo D. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.12, pp. 13-16, 1991.
- SIPPEL, W.L. Diagnosis of clostridial disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.161, p.1299-1305. 1972.
- SMITH, L.D.S. and WILLIAMS, B.L. **The Pathogenic Anaerobic Bacteria**. 3rd edn. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas. 1984.

TIMONEY, J. F., GILLESPIE, J. H., SCOTT, F. W. and BARLOUGH, J. E. The genus *Clostridium*. **Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**, 8th edn, pp. 214–218. 1988. Comstock Publishing Associates, London.

UZAL F.A.; KELLY W.R. Enterotoxaemia in goats: A review. **Veterinary Research Community**. v.20; p.481-492. 1996.

VAN METRE D.C.; TYLER J.W.; STEHMAN S.M. Diagnosis of enteric disease in small ruminants. **Veterinary Clinical North America Food Animal Practice**. v.16, n.1, p.87-115. 2000.

WILKENS, C.A., RICHTER, M.B., HOBBS, W.B., WHITCOMB, M., BERGH, N., CARSTENS, J. Occurrence of *Clostridium tetani* in soil and horses. **South African Medical Journal**. v.73, pp. 718-720. 1988.

WILLIAMS, B.M. Enterotoxemia dos ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto de Pesquisa Desidério Finamor**. v.3, pp. 30-40. 1966

WOOLCOCK, J.B. **Bacterial infection and immunity in domestic animals**. 1979. Oxford & New York: Elsevier Scientific Publishing Company.

ANEXO A**MIONECROSE AGUDA POR *Clostridium septicum* EM EQUINOS**

**Djeison Lutier Raymundo, Saulo Petinatti Pavarini, Pedro Soares Bezerra Junior,
Nadia Aline Bobbi Antoniassi, Paulo Mota Bandarra, Bernardo Stefano Bercht,
Marcos Gomes & David Driemeier**

**ARTIGO 1 - ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM
PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA
Volume 30, Número 9 (Setembro) de 2010**

Trabalho 1901 LD

(Adapt,p.PVB, 23.3.10)

Mionecrose aguda por *Clostridium septicum* em equinos³

Djeison Lutier Raymundo², Saulo Petinatti Pavarini², Pedro Soares Bezerra Junior³,
Nadia Aline Bobbi Antoniassi², Paulo Mota Bandarra², Bernardo Stefano Bercht⁴,
Marcos José Pereira Gomes⁴ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Raymundo D.L., Pavarini S.P., Bezerra Junior P.S., Antoniassi N.A.B., Brecht, B.S, Gomes M.J.P. & Driemeier D. 2010. [**Acute myonecrosis by *Clostridium septicum* in horses.**] Mionecrose aguda por *Clostridium septicum* em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Two cases of acute necrotizing myositis caused by *Clostridium septicum* in horses are described. Both horses presented swelling of the right pelvic limb extending to the ventral abdominal region. The cut surface of the affected area revealed blood-stained edema and gas bubbles. The skeletal muscles of the caudal region of the thigh of the affect limbs had dark red discolored areas of blood-stained edema and crepitation; the deep musculature was dry. The main histopathological findings were swelling, vacuolation and hyaline and floccular necrosis of skeletal myofibers; in between myofibers there were hemorrhage, edema and large amounts of bacilli. In both cases, *C. septicum* was isolated from the edema fluid of muscular lesions.

INDEX TERMS: Diseases of horses, *Clostridium septicum*, necrotizing myositis, myonecrosis.

³ Recebido em 23 de março de 2010.

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

² Setor de Patologia Veterinária (SPV), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil..

⁴ Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

RESUMO.- Descrevem-se dois casos de miosite necrosante causada por *Clostridium septicum* em equinos. Os dois equinos apresentavam aumento de volume no membro pélvico direito e que se estendia para a região abdominal ventral. Ao corte, essa área era formada por edema sanguinolento e bolhas de gás. Os músculos esqueléticos da região caudal da coxa apresentavam áreas vermelho-escuras, crepitantes, com edema sanguinolento e, ao corte, as áreas mais profundas da musculatura tinham aspecto seco. As principais alterações histopatológicas observadas foram tumefação, vacuolização, necrose hialina e necrose flocular de fibras musculares esqueléticas. Entre as fibras, havia hemorragia, edema e grande quantidade de bacilos com tamanho de 3-6µm. Na coloração de Gram, os bacilos se apresentavam roxos (Gram-positivos); quando impregnados pela prata (Warthin-Starry), se mostraram enegrecidos. Nos dois casos, *C. septicum* foi isolado, em ambiente anaeróbio, do líquido de edema das lesões musculares.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de equinos, *Clostridium septicum*, miosite necrosante, mionecrose.

INTRODUÇÃO

Miosite por clostrídios, mionecrose e edema maligno são algumas das denominações utilizadas para designar infecções necrosantes em tecidos moles associadas a *Clostridium* spp. em equinos (Peek et al. 2003). Em animais de produção, essas lesões podem estar associadas com castração, tosquia, feridas penetrantes, injeções e lesões relacionadas à parição (Radostits et al. 2007). A mionecrose é frequentemente observada em bovinos, ovinos e caprinos, que são as espécies mais suscetíveis. Suínos e equinos apresentam menor susceptibilidade. Em equinos, *C. perfringens* e *C. septicum* são as bactérias mais frequentemente observadas em casos de mionecrose (Jeanes et al. 2001, Peek et al. 2003), mas *C. chavoei* (Hagemoser et al. 1980), *C. novy* (Graham, 1940) e *C. fallax* (Cooloe et al. 1983) também ocorrem nesses casos. *C. septicum* é um bacilo gram-positivo grande (tamanhos de 3-6µm), móvel e anaeróbico obrigatório (Odendaal & Kriek 2004) que produz quatro diferentes toxinas. A mais importante, alfa toxina, é hemolítica e necrótica e, em associação com as outras toxinas, causa danos ao endotélio vascular e membrana plasmática muscular (Rebhun et al. 1985, Perdrizet et al, 1987). Os animais afetados desenvolvem os sinais clínicos em aproximadamente 48 horas após a inoculação ou

injúria (Jeanes et al. 2001) e apresentam febre, depressão, toxemia e inchaço muscular, muitas vezes, com dor associada. Essa lesão muscular inicialmente se apresenta hiperêmica, quente, macia e delimitada; posteriormente se torna escura, fria, firme e necrosada (Reed, 1955, Rebhun et al. 1985). Em muitos casos, o exame de palpação do local afetado revela acúmulo de gás no tecido subcutâneo e músculos adjacentes; entretanto, pode estar ausente (Perdrizet et al. 1987, Jeanes et al. 2001). Na necropsia, observa-se grande quantidade de líquido inflamatório serosanguinolento no tecido subcutâneo. Em alguns casos, há apenas grande quantidade de gás no tecido subcutâneo e fâscias sem lesão muscular, a qual, quando presente é caracterizada por intensa miosite necrótica (Odendaal & Kriek 2004). Este trabalho relata os achados clínico-patológicos observados em dois casos de mionecrose aguda em equinos associados com infecções por *C. septicum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Um equino Quarto de Milha, macho de 7 anos de idade (Equino1) e outro, Crioulo, macho de 4 anos de idade (Equino2), foram necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Os dados da evolução da doença e sinais clínicos foram obtidos com o veterinário e proprietários responsáveis. Durante a necropsia, amostras de tecidos foram coletadas, fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, processadas pelas técnicas rotineiras de histopatologia, cortadas na espessura de 5µm e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Cortes de músculos esqueléticos foram também corados pela técnica de Gram e Warthin-Starry. Amostras de líquido de edema serosanguinolento foram coletadas da região subcutânea dos dois equinos, mantidas sob refrigeração e encaminhadas para cultivo microbiológico. Esses materiais foram inoculados por punção direta com a alça de platina e semeados em ágar sangue (7% de sangue ovino) e ágar Maconkey. As placas foram incubadas a 37°C em ambientes aeróbico e anaeróbico, com utilização do envelope AnaeroGen.

RESULTADOS

O Equino 1 apresentou aumento de volume no membro pélvico direito e cólica antes da morte. Três dias antes, esse animal tinha perdido a ferradura do membro torácico esquerdo, quando foi iniciado tratamento com antiinflamatório intramuscular. O Equino 2 estava há quarenta dias sendo preparado para apresentação, período no qual apresentou emagrecimento progressivo. Quinze dias antes da morte, hepatoprotetor e antiparasitário foram administrados intramuscularmente. No dia que antecedeu a morte, esse animal

apresentava dificuldade de locomoção, ou relutância ao movimento. Imediatamente, recebeu antiinflamatório e demonstrou melhora leve do quadro clínico. No dia seguinte, o animal estava agonizando e com aumento de volume no membro pélvico direito, imediatamente antes da morte. Durante as necropsias dos dois equinos, observou-se aumento de volume nos membros pélvicos direitos que se estendiam até a região abdominal ventral (Fig.1). Ao toque, esses aumentos apresentavam crepitação que deixava uma depressão sob a pressão de um dedo (sinal de godê) (Fig.2). Ao corte, essas áreas apresentavam edema sanguinolento e bolhas de gás subcutâneo e intramuscular. Os músculos esqueléticos tinham áreas vermelho-escuras, crepitantes, com edema sanguinolento e, ao corte, aspecto seco (Fig.3). No equino 1, essa alteração foi observada nos músculos grácil, semi-membrâneo, glúteo bíceps, quadríceps femoral e glúteo superficial. No Equino 2, os músculos afetados incluíam glúteos superficial, acessório e médio, além de grácil e quadríceps femoral. No coração de ambos os equinos, observou-se petéquias na superfície epicárdica e, no equino 2, líquido serosanguinolento no interior do saco pericárdico. Os pulmões estavam congestos, com edema e petéquias subpleurais nos dois equinos. No exame histopatológico dos músculos esqueléticos afetados de ambos os equinos, observaram-se diversos graus de tumefação e vacuolização de fibras e numerosas fibras com necrose hialina e flocular. Entre as fibras musculares, havia edema e hemorragia, grande quantidade de bacilos e áreas de enfisema com discreto infiltrado de neutrófilos e monócitos (Fig.4) Na pele, havia congestão difusa acentuada, edema, hemorragia e enfisema com grande número de bacilos. Pela técnica de coloração de Gram, os bacilos se apresentaram roxos, coloração características de bactérias gram-positivas (Fig.5). Na técnica de impregnação pela prata (Warthin-Starry), esses bacilos se apresentaram enegrecidos (Fig.6). No exame microbiológico, observou-se em coloração direta do músculo, grande quantidade de células vegetativas, algumas esporuladas, compatíveis com *Clostridium* sp. Não houve qualquer crescimento em aerobiose; entretanto, após 48 horas, em ambiente anaeróbico, foi observado crescimento de incontáveis colônias β -hemolíticas com coloração branco-acizentadas, com bordos irregulares e crescimento em ondas. A coloração de Gram evidenciou esporos ovais e subterminais. Na microscopia de fase, observou-se motilidade. *C. septicum* foi isolado e identificado pelas características morfotintoriais e culturais.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de mionecrose aguda por *Clostridium septicum* nos dois equinos foi estabelecido pelos achados de necropsia e histopatologia e confirmado pelo isolamento microbiológico do agente a partir do líquido de edema das lesões. Os dois equinos deste trabalho infectados por *C. septicum* foram tratados com medicamentos injetáveis intramusculares, forma de inoculação do bacilo descrita na literatura como mais frequente (Rebhun et al. 1985, Peek et al. 2003). As regiões descritas como mais frequentemente afetadas incluem pescoço (músculo cervical), peito (peitoral) e membro pélvico (glúteos, semimembranáceo e semitendináceo); locais de eleição para aplicações intramusculares em equinos (Peek et al. 2003). Nos dois casos, a lesão se desenvolveu na região do membro pélvico e afetou principalmente músculos da região dorso-caudal da coxa, localização descrita por diversos autores como uma das regularmente afetadas por miosite necrosante em equinos; contudo associada à prevalência mais baixa (25%) do que a região cervical (71%) (Jeanes et al. 2001). Os dois equinos apresentaram evoluções clínicas distintas, o histórico do Equino 1 indica uma possível infecção pelo agente cerca de três dias antes da morte: enquanto que, no Equino 2, a inoculação parece ter ocorrido cerca de 15 dias antes. Os dois equinos apresentaram aumento de volume muscular um dia antes da morte. Muitos autores descrevem a infecção por *Clostridium* spp. em equinos com evolução aguda, de 24-48 horas (Rebhun et al. 1985, Brown et al. 1988, Peek et al. 2003); entretanto alguns equinos têm apresentado períodos maiores de evolução, de até duas semanas (Perdrizet et al. 1987). As lesões musculares encontradas na necropsia dos dois equinos são semelhantes às descritas previamente (Peek et al. 2003). A lesão inflamatória e necrótica da musculatura afetava área extensa e acometia diversos músculos. A maioria dos relatos sobre miosites necróticas em equinos se refere à infecção por *C. septicum* ou *C. perfringens* (Jeanes et al. 2001, Peek et al. 2003). Como esses casos apresentam uma evolução muito aguda é extremamente importante adotar medidas preventivas para evitar a infecção, pois o tratamento só é eficiente quando realizado nos estágios iniciais da doença (Peek et al. 2003). Medidas como higienização do local de aplicação de injeções, utilização de agulhas limpas e instituição de terapia antimicrobiana em casos de lesões perfurantes ou formação de porta de entrada para bactérias são indicadas (Brown et al. 1988).

Agradecimentos.- Ao CNPq e à CAPES, pela concessão de bolsas aos mestrandos e doutorandos do Setor de Patologia Veterinária. Ao médico veterinário Fernando Gonzáles, pelo

encaminhamento dos equinos para necropsia e informações complementares sobre os casos. Ao professor Cláudio Estêvão Farias da Cruz, pela revisão deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Brown C.M., Kaneene, J.B. & Walker R.D. 1988. Intramuscular injection techniques and the development of clostridial myositis or cellulites in horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193(6):668-670.
- Cooloe P.J., Ireland L. & Vaudery, J.C. 1983. *Clostridium fallax* as a cause of gas-oedema in a horse. *J. Comp. Pathol.* 93:595-601.
- Graham R. 1940. Reactions in horses following inoculation of a chick-embryo vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 97:38-39.
- Hagemoser W.A., Hoffman L.J. & Lundvall R.L. 1980. *Clostridium chavoiei* infection in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176:631-633.
- Jeanes, L.V., Magdesian K.G., Madigan J.E. & Meagher D. 2001. Clostridial myonecrosis in horses. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 23 (6):577-587.
- Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 2004. *Clostridium chauvoei* infections, p.1856-1862. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Odendaal M.W. & Kriek N.P.J. 2004. *Clostridium septicum* infections, p.1869-1873. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Peek S.F., Semrad S.D. & Perkins G.A. 2003. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equi. Vet. J.* 35 (1):86-92.
- Perdrizet J.A., Callihan D.R., Rebhun W.C. & Shin, S.J. 1987. Successful management of malignant edema caused by *Clostridium septicum* in a horse. *Cornell Vet.* 77 (4):328-338.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with bacteria – II, pp. 830-832. In: *Ibid* (Eds), *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Rebhun W.C., Shin S.J., King J.M., Baum K.H. & Patten V. 1985. Malignant edema in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187 (7):732-736.
- Reed C.H. 1955. Malignant edema infection in a horse. *Calif. Vet.* 8:30-33.

Legendas das Figuras



Figura 1 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Aumento de volume do membro pélvico direito com extravasamento de líquido sero-sanguinolento.



Figura 2 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Aumento de volume do membro pélvico direito com edema depressível (sinal de godê).



Figura 3 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Necropsia de equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Músculo esquelético com áreas vermelho escuras e edema sanguinolento, crepitantes e ao corte com aspecto seco.

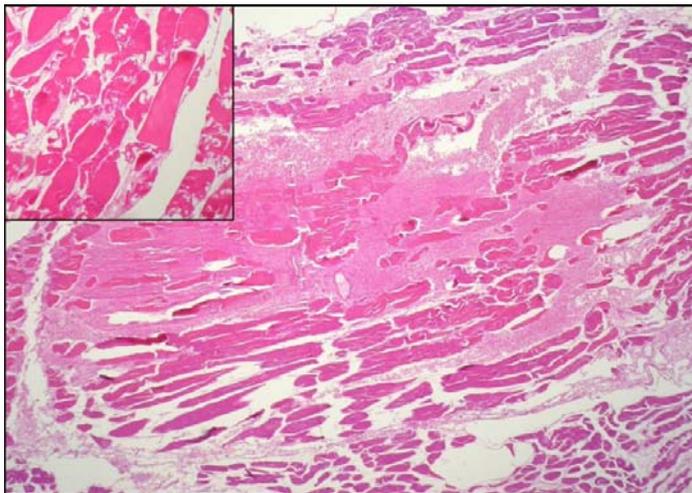


Figura 3 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Músculo esquelético. Tumefação, necrose hialina e necrose flocular de fibras musculares (detalhe, HE, obj. 20), entre as fibras musculares há edema e hemorragia. HE, obj 10.

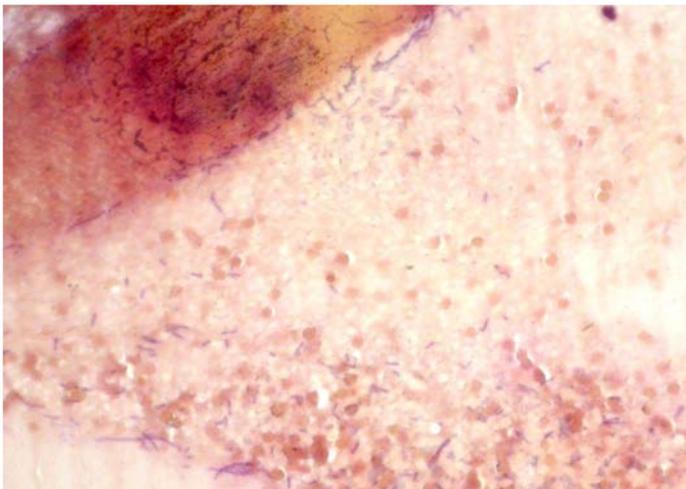


Figura 4 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Músculo esquelético. Grandes bacilos gram-positivos nas áreas de edema. Gram, obj 40.



Figura 5 – Clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Equino com miosite necrótica por *Clostridium septicum*. Músculo esquelético. Grandes bacilos de coloração enegrecida nas áreas de edema. Warthin-Starry, obj 40.

ANEXO B**BOTULISM IN WILD BIRDS**

**Djeison Lutier Raymundo, Raquel Von Hoendorff, Maria do Carmo Both,
Luciana Sonne, Fabiana Marques Boabaid, Ronnie A. Assis,
Rogerio Pinheiro Caldas & David Driemeier**

**ARTIGO 2 – SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM
JOURNAL OF ZOO AND WILDLIFE MEDICINE**

BOTULISM IN WILD BIRDS

OUTBREAK OF TYPE C BOTULISM IN BLACK-NECKED SWAN (CYGNUS MELANCORYPHUS)

**Djeison L. Raymundo; Raquel Von Hohendorf; Maria C. Both;
Luciana Sonne; Fabiana M. Boabaid; Ronnie A. Assis; Rogerio P. Caldas;
David Driemeier D.V.M., Ph.D*.**

From the Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brasil (Raymundo, Sonne, Boabaid, Driemeier). The Hospital Veterinário, Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, BR 116, Sapucaia do Sul-RS, Brasil (Hohendorf, Both). Laboratório Nacional Agropecuário, Avenida Rômulo Joviano s/nº, Centro 30380090, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil (Assis, Caldas).

*Corresponding author: E-mail address: davetpat@ufrgs.br (D. Driemeier). F: 005551 33086107

Abstract.

In the late summer, 2010, an outbreak of type C botulism affected the birds kept in a dam at a southern Brazilian zoo. A total of 11 (10 black necked swan Cygnus melancoryphus and 1 Muscovy duck Cairina moschata) out of 100 birds died after showing flaccid paralysis of the skeletal muscles characterized by general locomotion deficit, flight and swimming difficulties, dropped neck, and severe dyspnea. In the surroundings of the dam, there were carcasses of dead birds, some of which with large infestation by fly larvae. Shallow areas of the dam were associated with decreased water level by evaporation due to hot weather and showed collections of mud and decomposing organic matter. There were no significant pathological changes. Epidemiological and clinical findings indicated the diagnosis, which was confirmed by mouse bioassay and seroneutralization of type C botulism toxin.

Key words: Avian botulism, Clostridium botulinum, type C botulism, black-necked swan, Cygnus melancoryphus, Muscovy duck, Cairina moschata.

BRIEF COMMUNICATIONS

Botulism is caused by the ingestion of toxins produced by *Clostridium botulinum*.⁴ Under anaerobiosis, the spores of *C. botulinum* proliferate and produce the neurotoxins that are classified in eight different serotypes (A, B, C₁, C₂, D, E, F e G).¹⁰ Type C toxin is associated with most of the outbreaks in birds,^{5,9} especially aquatic birds.^{3,9,11} Two major sources of botulinum toxin have been identified. The first has been linked to contaminated water collections in dams and lakes, in which there have been a decrease in the oxygen content associated decomposing organic matter.^{1,7,9} This route of intoxication has been associated with botulism in birds kept in captivity.^{2,9} The second form of the disease has been linked to presence of the toxin in carcasses of dead animals, in which may have infestations with fly larvae that accumulate the toxins and attract the interest of the birds.^{3,9} Affected birds develop signs of progressive weakness, paresis, and flaccid paralysis of skeletal muscles characterized by general locomotion disorder, flight and swimming difficulties, dropped neck, and protrusion of the nictitating membranes.^{2,6} Diagnosis of the disease in birds is based on history, clinical signs, and absence of significant changes at necropsy,⁹ and the mouse bioassay with serum neutralization confirms the disease.⁸ This communications describes an outbreak of type C botulism in captive wild birds at a southern Brazilian zoo.

Four black-necked swans (*Cygnus melancoryphus*) and one Muscovy duck (*Cairina moschata*) were found moribund, euthanized, and necropsied at the Sapucaia do Sul Zoological Park in Rio Grande do Sul, Brazil. Clinical information was retrieved from the veterinarians in charge at the zoo. At necropsies, tissue samples were collected and fixed in 10% buffered formalin. Subsequently, these fragments were routinely processed for histology, sectioned at 5µm thickness, and stained with hematoxylin and eosin (HE). Samples from intestinal contents, liver, and serum were collected, stored under refrigeration, and submitted to the Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG), where samples of liver extract and serum from necropsied birds were inoculated intraperitoneally in mouse and subsequently seroneutralized with antitoxins C and D.

In the late summer 2010, a total of 11 out of approximately 100 birds, which were kept in the same dam (Fig.1A), died after showing comparable clinical signs that included flaccid paralysis of the skeletal muscles characterized by general locomotion deficit,

flight and swimming difficulties, dropped neck, and severe respiratory difficulty. Some birds showed deep depression, but when stimulated to move, presented exacerbated signs, sometimes culminating with death. Before deaths began, there was a period of three days in which birds have not received their normal commercial concentrate. In the enclosure where the birds had been kept, carcasses of additional dead birds (Fig.1B) were found, some with large infestation with fly larvae. There also were shallow areas (Fig.2A and B) of the dam in which the water level had decreased due to the warm weather and create large volumes of fetid mud associated with decomposing organic matter. At necropsy, birds appeared well nourished, and during the opening of the coelomic cavity, livers were diffusely yellowish. There were petechial hemorrhages in the epicardium, and large collection of fibrin on the mucosae from small intestines. In one swan, there was hemorrhagic content in the initial portion of the duodenum. All dead birds had dark red lungs with sanguineous fluid at cut surfaces. Microscopic findings included moderated fat degeneration of liver and marked pulmonary congestion. Mouse intraperitoneal inoculation of liver extract and serum from dead birds produced clinical disease undistinguishable from botulism. The typification and antitoxin seroneutralization identified type C botulism toxin as responsible for the outbreak.

Presumptive diagnosis was established by the association of epidemiological and clinical findings with the absence of significant pathological changes, whereas it was confirmed through the detection of type C botulinum toxin after intraperitoneal inoculation of liver extract and serum from dead birds in mouse. Detection of the most common epidemiological factors that have been associated with the occurrence of the disease in wild aquatic birds^{3,9} enforces the diagnosis. The ration deprivation by which birds were submitted may create an additional risk factor, since birds were forced to search for food in muddy and contaminated waters or carcasses of dead birds. There is an extent list of avian species that have been affected by type C botulism;⁹ however, no report of the disease in black-necked swan (Cygnus melancoryphus) was found.

Acknowledgement(s),

This study was funded by The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), Brazil. Authors are grateful to professor Cláudio Estêvão Farias Cruz, for reviewing this manuscript.

LITERATURE CITED

1. Crisley, F.D., Dowell, V.R., and R. Angelotti. 1968. Avian botulism in a mixed population of resident ducks in an urban river setting. *Bulletin of the Wildlife Disease Association* 4: 70-77.
2. Degernes, L.A. 2008. Waterfowl toxicology: a review. *Veterinary Clinics of Exotic Animals* 11: 283-300.
3. Duncan, R.M., and W.I. Jensen. 1976. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. *Journal of Wildlife Diseases* 12: 116-126.
4. Dutra, I.S., Weiss, H.E., Weiss, H., and J. Döbereiner. 1993. Diagnóstico de botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13: 83-86.
5. Graham, R., and I.B. Boughton. 1924. *Clostridium botulinum* type C associated with a limberneck-like-disease in chickens and ducks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 64: 723-727.
6. Haagsma, J., Over, H.J., Smith, T., and J. Hoekstra. 1972. Botulism in waterfowl in the Netherlands in 1970. *Netherlands Journal of Veterinary Science* 5: 12-33.
7. Marion, W.R., O'Meara, T.E., Riddle, G.D., and H.A. Berkhoff. 1983. Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 302-307.
8. Quortrup, E.R., and R.L. Sudheimer. 1943. Detection of botulinum toxin in the blood stream of wild ducks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 102: 264-266.

9. Rocke, T.E, and T.K. Bollinger. 2007. Avian Botulism. In.: Thomas, N.J., Hunter, D.B., Atkinson, C.T. (eds), *Infectious Diseases of Wild Birds*. Chapter 21, Blackwell Publishing, Oxford, pp.377-416

10. Smith, L.D.S., and H. Sugiyama. 1988. *Botulism: The Organisms, Its Toxins, The Disease*. 2nd edition, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois.

11. Wobeser, G. 1997. Avian Botulism – Another Perspective. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 151-156.



Figure 1. A. Dam in which birds were affected by type C botulism. B. Carcasses of dead birds infested with fly larvae provided an important risk factor for botulism in birds. Insert: carcass of fulvous whistling-duck *Dendrocygna bicolor* infested with fly larvae.



Figure 2. A and B. Shallow areas of the dam in which birds were kept. The water level had decreased due to the hot weather creating large volumes of mud associated with decomposing organic matter, in which birds searched for food.