

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DE ENTEROTOXEMIA POR *Clostridium*
perfringens TIPO D EM CAPRINOS NO BREJO PARAIBANO**

Karla Campos Malta

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DE ENTEROTOXEMIA POR *Clostridium*
perfringens TIPO D EM CAPRINOS NO BREJO PARAIBANO**

Karla Campos Malta

Orientador: Prof. Dr. Suedney de Lima Silva

Coorientador: Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2014

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB

M261a Malta, Karla Campos.
Aspectos clínicos, patológicos e diagnóstico laboratorial de enterotoxemia por
clostridium perfringens tipo D em caprinos no brejo paraibano./ Karla Campos Malta. –
Areia - PB: CCA/UFPB, 2014.
30 f. : il.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2014.

Bibliografia.
Orientador (a): Suedney de Lima Silva.
Coorientador: Edísio Oliveira de Azevedo.

1. Caprinos - doenças 2. Clostridiose 3. enterocolite I. Oliveira, Celso José Bruno
(Orientador) II. Título.

UFPB/BSAR CDU: 636.39.09(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

KARLA CAMPOS MALTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

AVALIAÇÃO EM 21/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Suedney de Lima Silva
Departamento de Ciências Veterinárias - UFPB
(Orientador)

Profª. Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo
Departamento de Ciências Veterinárias - UFPB
(Examinador)

Profª. Dra. Sara Vilar Dantas Simões
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - UFCG
(Examinador)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARLA CAMPOS MALTA – Nascida em Recife, Pernambuco, em 10 de julho de 1986. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009). Ocupa o cargo de Médica Veterinária da Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba Campus II - Areia desde 2010, atuando principalmente nas áreas de clínica médica de equídeos e de ruminantes e enfermidades infecciosas.

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus este trabalho, pois o Senhor me sustenta e me dá forças para lutar e alcançar meus objetivos. Aos meus pais por todo amor e cuidado dedicados a mim e a minha educação. Ao meu esposo, Ruy Brayner, por ser um grande companheiro e exemplo de pessoa. Aos meus familiares por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Suedney de Lima Silva, pela sua paciência, orientação, auxílio, conselhos e ensinamentos, muito obrigada por tudo!

A Ruy Brayner por além de seu companheirismo em casa e no trabalho, me ajudar nos atendimentos, necropsias e coletas de material deste estudo.

Aos meus amigos Daniela Lafetá, Rafael Lima e Roberta Mota, por sua amizade e por incentivar a prosseguir. A todos os meus amigos e colegas do Hospital Veterinário do CCA, que direta ou indiretamente me ajudaram e incentivaram a chegar até aqui.

Ao professor Ariosvaldo e a todos do setor de caprinocultura do CCA, que me ajudaram e me passaram as informações necessárias para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Francisco Lobato e a toda equipe do laboratório de Anaeróbios da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Lá, além de processar o material, me acolheram muito bem e me ensinaram muito. Foi de grande aprendizagem.

Ao professor Edísio Oliveira de Azevedo, pelo estabelecimento de contato com o professor Francisco Lobato, abrindo assim as portas do laboratório de Anaeróbios da UFMG, viabilizando desse modo à realização deste trabalho.

A todos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da UFPB, pelos auxílios, conhecimentos que me passaram e incentivo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO GERAL	iii
ABSTRACT.....	v
CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
CAPÍTULO I – ENTEROTOXEMIA POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D EM CAPRINOS NO BREJO PARAIBANO, BRASIL	06
Abstract.....	07
Resumo	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	09
Estudo epidemiológico e quadro clínico.....	09
Estudo patológico	09
Cultura, isolamento e genotipagem bacteriana.....	09
Soroneutralização em camundongos.....	10
Resultados	10
Discussão	10
Conclusões	12
Referências	12
Figuras	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Intestino delgado com serosa difusamente avermelhada de um caprino que veio a óbito subitamente.....	14
Figura 2. Fígado caprino vermelho-escuro e vesícula biliar dilatada com presença de conteúdo hemorrágico	14
Figura 3. PCR multiplex realizadas em cultura isolada das amostras de fezes de animais com doença sugestiva de enterotoxemia por <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, onde 324pb corresponde à toxina alfa; 196pb a toxina beta; 573pb a toxina beta2; 233pb a enterotoxina; 433pb a toxina iota; 600pb a toxina épsilon.....	15

ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ENTEROTOXEMIA POR *Clostridium perfringens* TIPO D EM CAPRINOS NO BREJO PARAIBANO

RESUMO GERAL – A enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo D é uma clostridiose que ocorre em diversas espécies de ruminantes e é frequentemente fatal. Apesar de existir vacina, é de difícil erradicação, causando prejuízo, principalmente a pequenos produtores, e na maioria das vezes o manejo vacinal não é seguido corretamente. Mudança na dieta com aumento de ingestão de carboidratos e/ou pastagens luxuriosas são fatores predisponentes para evolução da enfermidade. As características clínicas da doença em caprinos são diarreia com muco e sangue bastante proeminente, desidratação e dor abdominal. Na necropsia há presença de enterocolite grave. Mesmo existindo meios de controle e profilaxia contra as clostridioses, estas enfermidades continuam sendo um entrave na caprinocultura. Existem poucos relatos da ocorrência natural da enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D em caprinos no Brasil e, principalmente, da sua confirmação laboratorial. Este estudo relata surto de enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D em rebanho caprino leiteiro do Brejo Paraibano, demonstrando seus aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnósticos laboratoriais. O surto ocorreu em um rebanho de caprinos leiteiros, com faixa etária de dois a seis anos, cujo manejo reprodutivo/nutricional utilizado no rebanho era o *flushing*, no qual os animais passavam por um período de restrição de carboidratos e depois o retornavam em maior quantidade. Dezenove fêmeas apresentaram quadro clínico sugestivo de enterotoxemia com evolução hiperaguda e aguda, e destas, nove morreram. As demais fêmeas caprinas que adoeceram foram medicadas e se recuperaram. Destes animais, foram realizadas necropsias com coleta de amostras de tecido em apenas dois indivíduos. Os caprinos eram vacinados anualmente contra clostridioses, com vacina comercial polivalente, contendo o toxoide épsilon em sua composição, seguindo-se as recomendações de uso para esta espécie determinadas pelo fabricante. Após início do surto, todos os animais foram revacinados imediatamente. Para avaliação histopatológica coletou-se amostras dos intestinos delgado e grosso, cérebro, fígado e rins foram coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e enviados para serem examinados no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O conteúdo intestinal do jejuno, do íleo, do ceco e do cólon foi coletado. Essas amostras foram mantidas congeladas de julho a dezembro de 2012 e então encaminhadas ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG. Para o isolamento do *Clostridium perfringens*, o conteúdo intestinal das cabras foi semeado em placas com Agar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina), que foram

incubadas em ambiente de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Colônias características foram submetidas à extração térmica e submetidas a PCR multiplex, utilizando iniciadores específicos para os genes das toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpb-2*), épsilon (*etx*), iota (*ia*) e enterotoxina (*cpe*). Uma fração do conteúdo intestinal foi destinada à pesquisa de toxinas de *C. perfringens* pela técnica de soroneutralização em camundongos (SNC) que foi realizada no LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário). Ao exame histopatológico não verificou-se alterações conclusivas de enterotoxemia. Entretanto, *C. perfringens* foi isolado no cultivo bacteriológico sendo genotipada através de PCR multiplex confirmando o isolamento. A SNC, a partir do conteúdo intestinal, confirmou a presença apenas da toxina épsilon. O histórico associado aos achados necroscópico e diagnóstico laboratorial permitiram firmar o diagnóstico de enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. A enterotoxemia continua sendo uma doença importante na caprinocultura, que causa prejuízos econômicos consideráveis aos produtores mesmo existindo meios de profilaxia contra esta enfermidade. Os produtores devem ser orientados quanto ao manejo vacinal e nutricional que devem realizar em seus rebanhos a fim de tentar evitar esta enfermidade.

Palavras-chaves: Clostridiose, diarreia, enterocolite, PCR multiplex, ruminantes, soroneutralização

CLINICAL, PATHOLOGICAL AND LABORATORIAL DIAGNOSIS ASPECTS OF ENTEROTOXEMIA BY *Clostridium perfringens* Type D IN GOATS IN BREJO PARAIBANO, BRAZIL

ABSTRACT – The enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type D is a clostridiose that occurs in several species of ruminants and is often fatal. Although there is vaccine, is difficult to eradicate, causing damage, mainly to small producers, and most of the times the vaccine management is not followed correctly. Change in diet with increased carbohydrate ingestion and/or lush pastures are predisposing factors for development of disease. Clinical characteristics of the disease in goats are diarrhea with mucus and blood quite prominent, dehydration and abdominal pain. At necropsy there is presence of severe enterocolitis. Even though there are ways to control and prophylaxis against clostridial diseases, these disorders remain a obstacle within the goat farming. There are few reports of the natural occurrence of enterotoxemia by *C. perfringens* type D in goats in Brazil and mainly of laboratory confirmation. It is intended that this study reports an outbreak of enterotoxemia by *C. perfringens* type D in a herd of dairy goats in Brejo Paraibano demonstrating its clinical, epidemiological and laboratory diagnostic aspects through its classical and molecular methods. The outbreak occurred in a herd of dairy goats, aged 2-6 years where the reproductive/nutritional management used in the herd was flushing, where the animals passed a period of carbohydrate restriction and then returned in greater quantity. Nineteen females had a suggestive clinical of enterotoxemia and these nine died. The other goats that got sick were medicated and recovered. Animals that died had hyperacute and acute progression of the disease. These animals were made necropsy and tissue samples were collected from only two animals. The goats were vaccinated against clostridial diseases annually, with commercial polyvalent vaccine containing the epsilon toxoid in composition, following the recommendations of use for this species determined by the manufacturer. They were revaccinated immediately after the outbreak. For histopathologic evaluation of necropsy, samples of small and large intestine, brain, liver and kidneys were collected and fixed in neutral buffered 10% formalin and sent to be examined histologically in Sector of Pathology, School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais (UFMG). Intestinal contents of the jejunum, ileum, cecum and colon were collected during necropsy of two goats. The samples were kept frozen from July to December 2012 and then forwarded to the Laboratory of Anaerobes, Veterinary School, UFMG. For isolation of *C. perfringens*, the intestinal contents of the goats was seeded in SPS Agar plates (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine), incubated in an anaerobic environment at 37°C for 24 hours. Colonies were subjected to thermal characteristics extraction and subjected to multiplex PCR using specific primers for the genes of alpha toxin

(*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpi-2*), epsilon (*etx*), iota (*ia*) enterotoxin (*cpe*). A fraction of the intestinal contents was destined to the research the toxins of *C. perfringens* was made by the mouse neutralization test (MNT) which was held at National Agricultural Laboratory (LANAGRO). The fragments of organs necropsy revealed no conclusive alterations enterotoxaemia for examination by histopathology. However, from the bacterial culture was isolated bacterium that was genotyped by PCR multiplex and it was possible to confirm the isolation of *C. perfringens* type D. The MNT from the intestinal content confirmed the presence only of epsilon toxin. The history associated with necropsy findings and laboratory diagnosis data confirmed the diagnosis of enterotoxemia by *C. perfringens* type D. The enterotoxaemia remains an important disease in the goat that causes considerable economic losses to producers even existing prophylaxis against this disease. Producers should be counseled about the vaccination and nutritional management that must hold in their droves to try to prevent this disease.

Keywords: Clostridiose, diarrhea, enterocolitis, multiplex PCR, ruminants, serum neutralization

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Nordeste brasileiro tem sido destacado durante séculos como área de vocação para a exploração de ruminantes domésticos, notadamente caprinos e ovinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais destas espécies (LEITE; SIMPLÍCIO, 2005). A caprinocultura é de fundamental importância socioeconômica para a região Nordeste, sobretudo para os pequenos e médios produtores, contribuindo de forma significativa para a fixação do homem no campo (NOGUEIRA FILHO, 2003). Esta representatividade econômica pode ser observada através dos números da Pesquisa Pecuária Municipal 2010 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, na qual foi demonstrado que 90,8% dos caprinos do Brasil encontram-se nesta região. Deste total, 7,10% (600.607 animais) representam o efetivo caprino da Paraíba (IBGE, 2010).

A caprinocultura leiteira no Brasil se configura como atividade rentável, sendo possível de ser implantada com pouco investimento e em pequenas propriedades. Em função disso, tem contribuído para o desenvolvimento da atividade, constituindo uma alternativa extremamente importante para o agronegócio brasileiro. Os Estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba se destacam com as maiores produções de leite de cabra, 18.000 e 10.000 litros de leite/dia, respectivamente (SILVA; GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2012).

Sabidamente, falhas nos manejos nutricional, reprodutivo e sanitário são limitantes do desenvolvimento econômico da caprinovinocultura. Nesse sentido, as doenças parasitárias e infecciosas, como as clostridioses, causam severas perdas econômicas ao produtor.

As clostridioses dos pequenos ruminantes são causadas por microrganismos patogênicos do gênero *Clostridium*. Estes agentes são encontrados no solo e trato digestivo dos animais e do homem. Os clostrídios são bactérias anaeróbias que penetram no corpo do animal na forma de esporos, através de alimentos contaminados ou feridas. As toxinas são produzidas no organismo do animal ou são ingeridas pré-formadas. As infecções e intoxicações causadas por esses agentes

são responsáveis por grandes perdas econômicas nos sistemas de produção de pequenos ruminantes (LOBATO; SALVARANI; ASSIS, 2007). Apesar de conhecidas há tempos, ainda representam alto risco para as criações de ovinos e caprinos, por causa das grandes perdas econômicas e dos problemas de ordem sanitária que acarretam (SMITH; SHERMAN, 2009).

O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A-E), com base na produção de quatro toxinas principais, alfa, beta, épsilon e iota. As afecções causadas por *C. perfringens* ocorrem sob condições específicas e na presença de determinados fatores predisponentes. Como consequência, ocorre a multiplicação do agente no trato gastrointestinal dos animais e produção de exotoxinas, principais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro nosológico (POPOFF; BOUVET, 2009).

O *Clostridium perfringens* produz doenças entéricas, chamadas enterotoxemias, em ovinos, caprinos e outros animais. O *C. perfringens* tipo D causa a enterotoxemia, comumente denominada de doença da superalimentação ou do rim polposo. Este micro-organismo é um habitante normal do intestino de muitas espécies, mas quando o ambiente intestinal é alterado por mudanças bruscas na dieta ou outros fatores, o *C. perfringens* prolifera e produz toxinas potentes que agem localmente ou são absorvidas pela circulação com efeitos devastadores ao hospedeiro (SCHOLES et al., 2007; UZAL; SONGER, 2008).

A enterotoxemia é uma enfermidade de distribuição mundial (UZAL et al. 1994; VAIKOSEN; IKHATUA, 2005; SCHOLES, et al., 2007). No Brasil casos de enterotoxemia em caprinos por *C. perfringens* tipo D foram relatados por Baldassi et al. (1995) e Colodel et al. (2003) no estado do Rio Grande do Sul, Miyashiro et al. (2007) no estado de São Paulo e Oliveira et al. (2010) no estado da Paraíba.

Esta doença afeta principalmente cordeiros de três a 10 semanas de idade, mas também acomete caprinos, suínos e bovinos. Se após a ocorrência dos primeiros casos não forem implementadas medidas de controle, a morbidade e a letalidade podem chegar a 10% e 100%, respectivamente (RIET-CORREA et al., 2007). Enterotoxemia em caprinos ocorre em todo o mundo com animais de qualquer idade acima de duas semanas (UZAL; KELLY, 1996).

O *C. perfringens* tipo D é esporadicamente isolado de animais sadios. A participação deste micro-organismo nos quadros de enterotoxemia está associada a

fatores que favoreçam o crescimento bacteriano e produção de potentes toxinas, presença da bactéria no intestino delgado, a produção intestinal de enzimas proteolíticas como a tripsina, a disponibilidade de substrato para o crescimento bacteriano e a susceptibilidade do animal (FACURY FILHO et al., 2009). Níveis elevados de carboidratos, dietas ricas em proteína e pastagens luxuriantes estão dentre os fatores que alteram o ambiente intestinal e podem permitir abundante crescimento de *C. perfringens* e produção de toxinas (SMITH; SHERMAN 2009).

O agente se multiplica em proporções logarítmicas entre quatro a oito horas, produzindo grandes quantidades da toxina épsilon. A atividade biológica primária da toxina épsilon é a geração de edema. Esta toxina é letal e dermonecrótica. A toxina atua sobre o epitélio intestinal, causando aumento da permeabilidade vascular. Ao ganhar a circulação geral, chega aos órgãos, como cérebro, rins, pulmões, fígado e coração, onde se liga a receptores específicos nas células endoteliais, levando a uma degeneração dessas células (UZAL et al., 1997; MORRIS; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, 2009).

Três formas clínicas distintas de enterotoxemia são reconhecidas em caprinos, hiperaguda, aguda e crônica. A forma hiperaguda ocorre mais freqüentemente em caprinos jovens do que adultos. O curso clínico é geralmente menos de vinte e quatro horas. Os sinais clínicos incluem uma súbita perda de apetite, profunda depressão, desconforto abdominal e profusa diarreia aquosa contendo sangue e muco. As recuperações são raros, mesmo com tratamento. Na forma aguda, os sinais clínicos são semelhantes, mas são vistos com menos severidade. O curso clínico dura de três a quatro dias. Desidratação grave e acidose causadas pela diarreia profusa, tornam-se fatores agravantes nesses casos. Recuperações espontânea pode ocorrer, mas a maioria dos animais morre se não for tratada. Esta forma afeta mais frequentemente caprinos adultos. Pode ocorrer em rebanhos com uma sólida história de vacinação contra a *C. perfringens* tipo D, de modo que não deve ser enterotoxemia excluída a partir de vacina anterior. Na forma crônica, animais adultos geralmente são afetados. Há perda de peso progressiva com diarreia intermitente (SMITH; SHERMAN, 2009).

Na necropsia observa-se avermelhamento em alguns segmentos do intestino delgado; essa alteração é mencionada por alguns autores como enterite

hemorrágica segmentar. Os rins apresentam-se amolecidos, com marcada diminuição da consistência e aspecto característico de autólise, mesmo que a necropsia seja realizada antes de ocorrer autólise em outros órgãos. Esta lesão renal é designada como rim polposo e pode não ocorrer em ovinos adultos. Outras lesões menos específicas são a presença de líquido nas cavidades e hemorragias nas serosas, principalmente no pericárdio e endocárdio (RIET-CORREA et al., 2007). A doença em caprinos com frequência apresenta uma enterocolite hemorrágica (SONGER, 1996). Nesta espécie é mais frequente a ocorrência de lesões intestinais (UZAL; KELLY, 1996, UZAL et al., 1997).

Histórico, sinais clínicos e achados necroscópicos são ferramentas usuais para o estabelecimento do diagnóstico presuntivo de enterotoxemia por *C. perfringens* em caprinos e ovinos, entretanto, nenhum diagnóstico definitivo pode ser feito sem confirmação laboratorial (UZAL, 2004). O critério mais aceito no estabelecimento de um diagnóstico definitivo de enterotoxemia é a detecção de toxinas de *C. perfringens* em conteúdo intestinal. Além disso, o exame histopatológico do cérebro é muito útil para o diagnóstico da doença do tipo D, tal como lesões produzidas pela toxina épsilon nos cérebros de ovelhas e cabras (UZAL; SONGER, 2008).

A técnica de PCR vem sendo utilizada para identificar e tipificar o *C. perfringens*, comparado com a técnica clássica, demonstrou ser muito mais rápido, com os resultados obtidos em algumas horas, e muito mais confiável (MIYASHIRO et al., 2007). A técnica da PCR Multiplex é mais simples e rápida por detectar simultaneamente fragmentos gênicos das toxinas principais e das toxinas beta-2 (*cpb-2*) e enterotoxina (*cpe*) com acurácia e rapidez (YOO et al. 1997; VIEIRA et al., 2008).

A erradicação da enterotoxemia é quase impossível e o controle e a profilaxia são baseados na vacinação sistemática dos rebanhos com toxoides épsilon. É reconhecido que a vacinação com toxoide epsilon não confere ao caprino o mesmo nível de proteção que ocorre no ovino, e que a persistência de anticorpos séricos contra a toxina em níveis protetores em caprinos é limitado. Caprinos devem ser vacinados em intervalos de 3-4 meses para manter a proteção adequada contra

enterotoxemia, especialmente em rebanhos onde há histórico da doença (SMITH; SHERMAN, 2009).

A qualidade das vacinas contra clostridioses varia muito entre os países e os fabricantes de vacinas. As vacinas não são sempre corretamente transportadas, armazenadas e/ou administradas. Além disso, a variação individual de respostas imunológicas entre animais ocorre frequentemente em ovinos e caprinos (UZAL, 2004). Pesquisa realizada por Lobato et al. (2000), revelou que de sete vacinas comercializadas no Brasil até o momento do estudo, apenas duas apresentaram níveis de anticorpos satisfatórios em um teste de potência realizado em ratos.

Mesmo existindo meios de controle e profilaxia contra as clostridioses, estas enfermidades continuam sendo um entrave na caprinocultura. Existem poucos relatos da ocorrência natural da enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D em caprinos no Brasil e, principalmente, da sua confirmação laboratorial. Pretende-se com este estudo relatar um surto de enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D em rebanho caprino leiteiro do Brejo Paraibano, demonstrando seus aspectos clínicos, epidemiológicos, bem como seu diagnóstico laboratorial através de métodos clássico e molecular. Estes conhecimentos contribuirão significativamente para melhoria do manejo profilático da clostridiose caprina a ser adotado pelos produtores, visando redução das perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade e maior produtividade do rebanho.

CAPÍTULO I

ENTEROTOXEMIA POR *Clostridium perfringens* TIPO D EM CAPRINOS NO BREJO PARAIBANO, BRASIL

Enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos no Brejo Paraibano, Brasil¹

Karla C. Malta^{2*}, Ruy B. Oliveira Filho³, Prhiscylla S. Pires⁴, Luciana A. Gonçalves⁴, Felipe M. Salvarani⁴,
Edísio O. Azevedo⁵, Francisco C.F. Lobato⁴ e Suedney L. Silva³

ABSTRACT.- Malta K.C., Oliveira Filho R.B., Pires P.S., Gonçalves L.A., Salvarani F.M., Azevedo E.O., Lobato F.C.F. & Silva S.L. 2014. [Enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type D in goats in Brejo Paraibano, Brazil.] Enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D em caprinos no Brejo Paraibano, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, CCA/UFPB, s/n., Cidade Universitária, Areia, PB 58.397-000, Brasil. *Autor para correspondência: kmaltinha@gmail.com

This paper reports an outbreak of enterotoxemia in a herd of dairy goats with 57 animals, crossbred Saanen, aged two to six years, belonging to the Department of Goat's Center for Agricultural Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, Paraíba. These animals two were males and 55 were females. During the period April-July 2012, nineteen females had a clinical diagnosis of enterotoxemia and of these, nine died. The other goats were medicated females who got sick and recovered. Animals that died had subacute and acute progression of the disease. The reproductive/nutritional management flock is used in *flushing*, where the animals go through a period of carbohydrate restriction and then return in greater quantity. Moderate to severe dehydration, diarrhea with mucus and blood, abdominal cramps, tachycardia, tachypnea, congested mucous membranes and injected episcleral vessels and depression were observed. Two animals were necropsied and samples were collected from small and large intestine, liver, kidneys and brain and intestinal contents. The *C. perfringens* type D was isolated in pure culture and was characterized by multiplex polymerase chain reaction (PCR). The presence of epsilon toxin in intestinal contents was detected by mouse neutralization test (MNT). The combinations of flushing over the lush pastures were determining factors for the initiation and maintenance of this outbreak of enterotoxemia. Vaccination against clostridial diseases in goats should be performed every 3-4 months to confer effective immunity. From the genotyping was possible to accurately identify the bacteria responsible for the outbreak.

INDEX TERMS: Clostridiose, diarrhea, ruminants, mouse neutralization test, epsilon toxin.

RESUMO - Relata-se um surto de enterotoxemia em um rebanho de caprinos leiteiros com 57 animais, mestiços da raça Saanen, com faixa etária de dois a seis anos, pertencentes ao Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. Destes animais dois eram machos e 55 eram fêmeas. Durante o período de abril a julho de 2012, dezenove fêmeas apresentaram quadro clínico sugestivo de enterotoxemia e destas, nove morreram. As demais fêmeas caprinas que adoeceram foram medicadas e se recuperaram. Os animais que morreram tiveram evolução hiperaguda à aguda da doença. O manejo reprodutivo/nutricional utilizado no rebanho era o *flushing*, onde os animais passavam por um período de restrição de carboidratos, que depois retornava em maior quantidade. Os sinais clínicos observados foram desidratação de moderada a grave, diarreia com muco e sangue, cólicas abdominais, taquicardia, taquipneia, mucosas congestas e com vasos episclerais injetados e depressão. Dois animais foram necropsiados e coletados fragmentos de intestino delgado e grosso, fígado, rins e cérebro, bem como conteúdo intestinal. O *C. perfringens* tipo D foi isolado em cultura pura e foi caracterizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. A presença da toxina épsilon no conteúdo intestinal foi detectada pelo teste de soroneutralização em camundongos (SNC). A combinação do flushing mais as pastagens luxuriantes foram fatores determinantes para o início e manutenção deste surto de enterotoxemia. A vacinação contra clostridioses na espécie caprina deve ser realizada a cada 3-4

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, Centro de Ciências Agrárias, Cidade Universitária, Areia, PB 58.397-000, Brasil.

³ Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, CCA/UFPB, s/n., Cidade Universitária, Areia, PB 58.397-000, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, Campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, MG 30.123-970, Brasil.

⁵ Docente da Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Av. Marechal Rondon, s/n, São Cristóvão, SE 49.100-000, Brasil.

meses para conferir uma imunidade efetiva. A partir da genotipagem foi possível identificar com acurácia a bactéria responsável pelo surto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Clostridiose, diarreia, ruminantes, soroneutralização em camundongos, toxina épsilon.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é de fundamental importância socioeconômica para a região Nordeste, sobretudo para os pequenos e médios produtores, contribuindo de forma significativa para a fixação do homem no campo (Nogueira Filho, 2003). A representatividade econômica para esta região pode ser observada pelo seu rebanho, que representa 90,8% dos caprinos do Brasil. Deste total, 7,10% (600.607 animais) representam o efetivo caprino da Paraíba (IBGE 2010). Essa atividade econômica pode ser seriamente comprometida pelas doenças que acometem os animais, especialmente as doenças infecciosas, que causam severos danos à saúde dos caprinos e a consequente redução da produtividade ou mesmo sua morte.

As clostridioses em pequenos ruminantes são causadas por micro-organismos patogênicos do gênero *Clostridium*. Estes agentes são encontrados no solo e trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis (Lobato et al. 2007). As bactérias deste gênero são bastonetes, Gram-positivos e anaeróbios. Devido à alta capacidade de esporulação da maioria das bactérias patogênicas desse grupo, as infecções e intoxicações causadas pelo gênero *Clostridium*, conhecidas por clostridioses, são de difícil erradicação e estão entre as principais enfermidades dos animais domésticos em todo mundo, principalmente de ruminantes (Lobato et al 2013). Apesar de conhecidas há tempos, ainda representam alto risco para as criações de ovinos e caprinos, por causa das grandes perdas econômicas e dos problemas de ordem sanitária que acarretam (Smith & Sherman 2009).

O *Clostridium perfringens* produz doença entérica, chamada enterotoxemia, em ovinos, caprinos e outros animais (Uzal & Songer 2008). O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A-E), com base na produção de quatro toxinas principais, alfa, beta, épsilon e iota (Popoff & Bouvet 2009). O *C. perfringens* tipo D causa a enterotoxemia, comumente denominada de doença da superalimentação ou do rim polposo. Este micro-organismo é um habitante normal do intestino de muitas espécies, mas quando o ambiente intestinal é alterado por mudanças bruscas na dieta ou outros fatores, o *C. perfringens* prolifera e produz toxinas potentes que agem localmente ou são absorvidas pela circulação com efeitos devastadores ao hospedeiro (Scholes et al. 2007, Uzal & Songer 2008). A atividade biológica primária da toxina épsilon é a geração de edema. Esta toxina é letal e dermonecrótica. Uma propriedade básica da toxina épsilon é que ela aumenta a permeabilidade vascular pela alteração de junções estreitas entre as células endoteliais, provocando danos e edema em várias órgãos, tais como pulmões, coração, rins e cérebro (Morris & Fernández-Miyakawa 2009).

O histórico, os sinais clínicos e os achados necroscópicos são ferramentas usuais para o estabelecimento do diagnóstico presuntivo de enterotoxemia por *C. perfringens* em caprinos e ovinos, entretanto, nenhum diagnóstico definitivo pode ser feito sem confirmação laboratorial (Uzal 2004). O critério mais aceito para estabelecimento de um diagnóstico definitivo de enterotoxemia é a detecção e tipificação das toxinas principais de *C. perfringens* em conteúdo intestinal, a partir da soroneutralização em camundongos (SNC) (Uzal & Songer 2008). Apesar da SNC ser considerado o teste diagnóstico padrão ouro na tipificação do *C. perfringens*, e sua reconhecida sensibilidade e especificidade, é um método demorado e relativamente caro, além de que, outro ponto limitante é a instabilidade das toxinas, rapidamente degradadas por enzimas bacterianas e teciduais (Parreiras et al. 2002, Sanz et al. 2007, Vieira et al. 2008). Como alternativa, amostras de *C. perfringens* podem ser genotipificadas através da PCR convencional ou da PCR Multiplex. Embora a utilização da PCR tenha valor diagnóstico limitado, ela propicia uma rápida identificação do agente por detectar simultaneamente fragmentos gênicos das principais toxinas e das toxinas beta-2 (*cpb-2*) e enterotoxina - *cpe* (Uzal et al. 1997). A identificação de tipos e subtipos de *C. perfringens* é importante para o desenvolvimento e avaliação de programas de vacinação, além de auxiliar no reconhecimento da epidemiologia das infecções por esse agente e na caracterização dos mesmos (Shinya et al. 2006).

A doença tem distribuição mundial (Uzal et al. 1994, Vaikosen & Ikhatua 2005, Scholes et al. 2007). No Brasil, casos de enterotoxemia em caprinos por *C. perfringens* tipo D foram relatados por Baldassi et al. (1995), Colodel et al. (2003), Miyashiro et al. (2007) e Oliveira et al. (2010), este sendo no estado da Paraíba. Apesar da reconhecida importância da doença, os relatos são esparsos e poucos são os diagnósticos laboratoriais com completa caracterização do agente.

Existem poucos relatos da ocorrência natural da enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D em caprinos no Brasil e, principalmente, da sua confirmação laboratorial. Conhecimento de dados epidemiológicos e clínicos de surtos desta enfermidade contribuem significativamente para melhoria no manejo profilático da clostridiose caprina a ser adotado pelos veterinários e produtores desta espécie, visando redução das perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade e maior produtividade do rebanho, pois mesmo existindo meios de controle e profilaxia para as clostridioses, estas doenças continuam sendo um entrave na caprinocultura devido aos prejuízos econômicos decorrentes das perdas de animais. Logo, objetivou-se com este trabalho descrever os aspectos epidemiológico e clínico, bem como seu diagnóstico laboratorial em surto de enterotoxemia em caprinos leiteiros na Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo epidemiológico e quadro clínico:

Para o estudo epidemiológico do surto de enterotoxemia foram obtidas informações sobre os manejos sanitário, nutricional e reprodutivo utilizado no rebanho do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia - Paraíba, bem como dados sobre os animais que vieram a óbito antes de uma avaliação clínica. O surto ocorreu no período de abril a julho de 2012.

Estudo patológico:

Para avaliação histopatológica dos animais necropsiados, amostras dos intestinos delgado e grosso, cérebro, fígado e rins foram coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e enviados para serem examinados histologicamente no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes histológicos de três micrômetros de espessura, que foram examinados em microscopia óptica de luz (Luna 1968).

Cultura, isolamento e genotipagem bacteriana:

O conteúdo intestinal do jejuno, do íleo, do ceco e do cólon foram coletados durante a necropsia de dois caprinos. As amostras foram mantidas congeladas e encaminhadas para o Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG. Para o isolamento do *Clostridium perfringens*, o conteúdo intestinal das cabras foi semeado em placas com Agar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina), que foram incubadas em ambiente de anaerobiose, a 37°C por 24 horas. As colônias características foram submetidas à extração térmica (Baums et al. 2004) e à PCR multiplex, utilizando iniciadores específicos para os genes das toxinas alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta-2 (*cpb-2*), épsilon (*etx*), iota (*ia*) e enterotoxina (*cpe*) (Viera et al. 2008).

Soroneutralização em camundongos:

Uma fração do conteúdo intestinal foi encaminhada ao LANAGRO na cidade de Pedro Leopoldo, MG, onde foi realizada a técnica. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração a 10.000 x G a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana com poro de 0,22µm e a pesquisa de toxinas de *C. perfringens* foi realizada pela técnica de soroneutralização em camundongos, segundo Tammemaggy & Grant (1967).

RESULTADOS

O surto de enterotoxemia ocorreu em um rebanho com 57 caprinos, mestiços da raça Saanen, com faixa etária de dois a seis anos, pertencentes ao Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. Destes animais dois eram machos e 55 eram fêmeas. Os animais eram vacinados anualmente contra clostridioses, com vacina comercial polivalente contendo o toxóide épsilon em sua composição. Durante o período de abril a julho de 2012, dezenove fêmeas apresentaram sinais de doença entérica sugestiva de enterotoxemia e destas, nove morreram. As demais fêmeas caprinas que adoeceram (dez) foram medicadas e se recuperaram. Resultando em taxas de morbidade e letalidade de 33,3% e 47,4%, respectivamente.

Os animais eram criados em regime semi-intensivo, onde recebiam 500g de concentrado/animal/dia e eram levados ao pasto, e na estação de monta, os animais eram submetidos ao manejo reprodutivo/nutricional denominado *flushing*. Este manejo de preparação para o período de monta foi determinado pela restrição do concentrado por nove dias e o subsequente incremento no fornecimento, principalmente de carboidratos.

Após este período de mudança no manejo alimentar, dezenove fêmeas apresentaram quadro clínico sugestivo de enterotoxemia. Os animais acometidos apresentavam desidratação moderada a grave, mucosas congestas e vasos episclerais injetados, depressão, diarreia com muco e sangue, dor abdominal, taquicardia, taquipneia e hipomotilidade a atonia ruminal. Das nove cabras que morreram duas foram necropsiadas. As mortes ocorreram em um intervalo entre 24-48 horas do aparecimento dos sintomas, e em apenas um caso o animal morreu subitamente.

Foi realizado tratamento com uso de soluções hidroeletrólíticas isotônicas em volume dependente do percentual de desidratação. Foi utilizado flunixin meglumine na dose de 1mg/kg por via intravenosa a cada doze horas. Penicilinas G benzatina e G procaína foram utilizadas sistemicamente na dose de 20.000UI/kg. Logo após o início do surto, todos os animais foram revacinados.

Os animais necropsiados apresentavam-se com escore corporal 3 a 3,5 (Feitosa 2008). Na necropsia do primeiro animal foram observadas hemorragia puntiforme no abomaso, enterite segmentar no intestino delgado e presença de líquido na cavidade abdominal. O segundo animal morreu subitamente e o tratador relatou um curso de aproximadamente três horas entre o início da doença e o óbito. A necropsia foi realizada imediatamente após a morte do animal, sendo observada a serosa do intestino delgado (Fig. 1) e intestino grosso difusamente avermelhada, rins e fígado com coloração vermelho-escuro, vesícula biliar dilatada com presença de conteúdo hemorrágico (Fig. 2) e bexiga com mucosa avermelhada.

Os fragmentos de órgãos dos animais necropsiados não revelaram alterações conclusivas de enterotoxemia ao exame histopatológico. Entretanto, a bactéria foi isolada, em seguida foi genotipada através de PCR multiplex, tornando-se assim possível a confirmação do isolamento de *C. perfringens* tipo D (Fig. 3). A soroneutralização em camundongos, a partir do conteúdo intestinal, confirmou a presença apenas da toxina épsilon. O histórico associado aos achados necroscópicos e diagnósticos laboratoriais permitiram firmar o diagnóstico de enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D.

DISCUSSÃO

Apesar de *C. perfringens* ser considerado comensal do trato gastrointestinal de animais, *C. perfringens* tipo D é esporadicamente isolado de animais sadios. A participação deste micro-organismo nos quadros de enterotoxemia está associada a fatores que favoreçam o crescimento bacteriano e produção de potentes toxinas, presença da bactéria no intestino delgado, a produção intestinal de enzimas proteolíticas como a tripsina, a disponibilidade de substrato para o crescimento bacteriano e a susceptibilidade do animal (Facury Filho et al. 2009). Acredita-se que, neste surto, os principais fatores predisponentes foram a mudança brusca na alimentação e falha no protocolo de imunização dos animais. Níveis elevados de carboidratos, dietas ricas em proteína e pastagens luxuriantes estão dentre os fatores que alteram o ambiente intestinal e podem permitir abundante crescimento de *C. perfringens* e produção de toxinas (Smith & Sherman 2009).

Neste surto, o *flushing* deve ter sido o fator inicial preponderante, predispondo os animais ao surto da doença durante os meses de abril a julho de 2012. Ademais, credita-se também às pastagens, que com o início das chuvas elevaram seus níveis nutricionais. No município de Areia, o acumulado de chuvas nos meses de maio, junho e julho foi respectivamente 102,5, 302,2 e 163,3mm (AES A 2014). Outros fatores que podem estar associados a surtos de enterotoxemia são as boas pastagens durante o período chuvoso, que possuem altos teores nutricionais e a suplementação com grãos ou seus derivados contendo carboidratos altamente fermentáveis (Oliveira et al. 2010). Entretanto, apesar do histórico de mudança dietética súbita ser um instrumento útil como indicador de possível enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D, a ausência deste precedente não impede o diagnóstico dessa doença em ovinos e caprinos (Uzal & Songer 2008).

Em virtude da sensibilidade dos caprinos à enterotoxemia, o uso de vacinação é recomendado para sua prevenção (Smith & Sherman 2009). Os animais afetados eram vacinados anualmente e após o início do surto foram revacinados, porém, casos da doença continuaram ocorrendo. Na maioria dos surtos relatados por Colodel et al. (2003), os animais não eram vacinados regularmente contra clostridioses. No

relato de Miyashiro et al. (2007), os animais haviam sido vacinados contra clostridioses quatro meses antes da morte. Em outro surto da doença, o rebanho havia sido vacinado contra enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D com apenas uma dose da vacina antes da ocorrência da doença, sendo as cabras revacinadas um mês após o início do surto e mais uma dose após três meses (Oliveira et al. 2010). As mortes só pararam após a terceira vacinação realizada no rebanho. Smith & Sherman (2009) recomendam que cabritos devam ser vacinados em intervalos de 3-4 meses para manter a proteção adequada contra enterotoxemia, especialmente em rebanhos onde há histórico da doença, e que as cabras devem ser vacinadas, pelo menos, semestralmente. A qualidade das vacinas contra clostridioses varia muito entre os países e os fabricantes, e as vacinas nem sempre são corretamente transportadas, armazenadas e/ou administradas. Além disso, a variação individual de respostas imunológicas entre animais ocorre frequentemente em ovinos e caprinos (Uzal 2004). De acordo com Lobato et al. (2000), de sete vacinas comercializadas no Brasil até o momento do estudo, apenas duas apresentaram níveis de anticorpos satisfatórios em um teste de potência realizado em ratos. Entretanto, desde 2009 os lotes de vacina contendo toxóide épsilon passaram a ser sistematicamente avaliadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, não sendo liberadas, para comercialização, partidas que não atingirem os limites considerados protetores. Caprinos vacinados com vacinas comerciais polivalentes contra enterotoxemia têm títulos de antitoxinas menores e menos duráveis que os observados em ovinos (Uzal et al. 1998).

As taxas de morbidade e letalidade (33,3% e 47,4% respectivamente), encontradas neste surto, diferem das encontradas por Baldassi et al. (1995), Colodel et al. (2003), Miyashiro et al. (2007), Riet-Correa et al. (2007) e Oliveira et al. (2010), onde eles observaram baixas morbidade e alta letalidade. Enquanto neste surto houve uma alta morbidade e moderada letalidade. Normalmente, a taxa de letalidade observada nos casos de enterotoxemia é elevada, atingindo percentuais de até 100%. Provavelmente, o menor percentual de letalidade observado deveu-se ao fato dos animais serem vacinados, ao menos anualmente, o que determinou um curso agudo da doença na maioria dos casos, possibilitando o uso de terapia antimicrobiana específica e tratamento de suporte eficazes.

Em caprinos adultos a doença pode ser hiperaguda, aguda ou crônica. A forma hiperaguda é mais frequentemente observada em animais adultos e caracterizada por diarreia hemorrágica, desconforto abdominal, choque grave, opistótono e convulsões, a evolução se dá em um período menor que 24 horas. Casos agudos podem ter evolução de 3-4 dias. Em casos crônicos pode haver diarreia intermitente (Smith & Sherman 2009). Segundo esta classificação, os quadros observados no presente relato podem ser classificados como hiperagudo e agudo. No relato de Oliveira et al. (2010), os animais morriam em um período de 1 a 14 dias. No surtos descritos por Colodel et al. (2003) os caprinos foram achados mortos entre 2-12 horas. Miyashiro et al. (2007) descreveram o caso de um caprino Boer em que a enfermidade teve evolução de um dia. Os sinais clínicos observados (desidratação moderada, mucosas congestionadas e vasos episclerais injetados, depressão, diarreia com muco e sangue, dor abdominal, taquicardia, taquipneia e hipomotilidade a atonia ruminal) foram semelhantes aos descritos por Colodel et al. (2003), Miyashiro et al. (2007), Riet-Correa et al. (2007) e Oliveira et al. (2010), principalmente com relação à diarreia sangüinolenta.

Dos dezenove animais que adoeceram, dez foram tratados, mediante hidratação, antibioticoterapia, com penicilinas G benzantina e G procaína, e anti-inflamatório não esteroide e conseguiram se recuperar. Tendo em vista que a toxina épsilon é secretada durante a fase de crescimento exponencial da bactéria, sugere-se que a antibioticoterapia possa ter controlado a sua fase de crescimento. A hidratação serve para corrigir a desidratação e evitar o choque e a acidose. O anti-inflamatório não esteroide é utilizado com intenção de estabilizar animais em choque toxêmico e aliviar a dor (Smith & Sherman 2009). Esses animais tiveram uma evolução aguda da doença, provavelmente, esta evolução deveu-se ao fato dos animais já terem tido contato com os toxóides pelas vacinações realizadas, ao menos anualmente.

Clinicamente, quando grandes quantidades de toxina épsilon são produzidas no intestino, ocorre a sua absorção para a circulação sistêmica, aumentando a permeabilidade capilar em vários órgãos e tecidos, incluindo a mucosa intestinal. Isto aumenta a sua taxa de absorção e, conseqüentemente, os efeitos sistêmicos que levam a lesões renais, hiperglicemia, hipertensão e edema em vários órgãos, incluindo o cérebro (Miyashiro et al. 2007). Assim como no presente relato, na necropsia podem ser observados quadros graves de colite hemorrágica pseudomembranosa, o que sugere uma susceptibilidade maior do epitélio intestinal do caprino à ação da toxina épsilon (Uzal & Kelly 1996). A doença em caprinos com frequência apresenta uma enterocolite hemorrágica (Songer 1996). Nesta espécie, é mais frequente a

ocorrência de lesões intestinais (Uzal & Kelly 1996, Uzal et al. 1997). Acredita-se que a ausência de lesões histológicas deve-se as evoluções aguda e subaguda dos casos.

Assim, o diagnóstico firmado no presente relato foi baseado em dados epidemiológicos, histórico clínico e alterações macroscópicas consistentes com quadros de enterotoxemia, isolamento bacteriano e identificação molecular de *C. perfringens* tipo D, através da realização da PCR multiplex, e detecção da toxina épsilon a partir do conteúdo intestinal.

O critério mais aceito no estabelecimento de um diagnóstico definitivo de enterotoxemia é a detecção de toxinas de *C. perfringens* em conteúdo intestinal através da soroneutralização em camundongos (Uzal & Songer 2008), porém, o diagnóstico de enterotoxemia não deve apenas ser baseado unicamente na detecção da toxina épsilon, mas também em dados clínicos e patológicos (Uzal et al. 2003). O diagnóstico de infecções por *C. perfringens* em animais é complexa e é apropriado contar com uma combinação de técnicas de diagnóstico, em vez de basear-se apenas em um teste (Uzal 2004). A técnica de PCR vem sendo utilizada para identificar e tipificar o *C. perfringens*. Comparado com a técnica clássica, este método demonstrou ser muito mais rápido, com os resultados obtidos em algumas horas, e muito mais confiável (Miyashiro et al. 2007). Além disso, a PCR pode ser uma importante ferramenta pela possibilidade de aplicação em tecidos fixados em formalina (Sanz et al. 2007). A técnica da PCR Multiplex é mais simples e rápida, por detectar simultaneamente fragmentos gênicos das toxinas principais e das toxinas beta-2 (*cpb-2*) e enterotoxina (*cpe*) (Yoo et al. 1997). A genotipagem de *C. perfringens* tem simplificado o diagnóstico de rotina através da PCR Multiplex, uma vez que possibilita tipificar grandes quantidades de amostras com acurácia e rapidez (Vieira et al. 2008). Apesar das muitas vantagens da PCR, ressalta-se que a mesma não é suficiente para fechar o diagnóstico de enterotoxemia (Uzal & Songer 2008), mas é de extrema valia na caracterização das estirpes patogênicas que circulam no Brasil.

CONCLUSÕES

A combinação do flushing mais as pastagens luxuriantes foram fatores determinantes para o início e manutenção do surto de enterotoxemia. Embora o flushing seja uma ferramenta importante no manejo reprodutivo, ele só deve ser utilizado em rebanho adequadamente imunizado contra clostridioses. O sucesso no tratamento dos animais doentes deveu-se ao quadro agudo da doença, provavelmente devido ao fato desses caprinos serem vacinados, ao menos anualmente. A partir da genotipagem foi possível identificar com acurácia a bactéria responsável pelo surto, possibilitando a adoção de medidas profiláticas específicas para esta espécie.

REFERÊNCIAS

- Agência Executiva de Gestão de Águas do Estado da Paraíba. AESA. Paraíba. Disponível em: <<http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do>>. Acesso em: 23 janeiro 2014.
- Baldassi L., Calil E.M.B., Portugal M.A.S.C., Moulin A.A.P. & Mourão M.A.F. 1995. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. Braz J Vet Anim Sci. 32:109-113.
- Baums C.G., Schotte, U., Amtsberg, G. & Goethe, R. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol. 100:11-16.
- Colodel E.M., Driemeier D., Schmitz M., Germer M., Nascimento R.A.P., Assis R.A., Lobato F.C.F. & Uzal F.A. 2003. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras. 23(4):173-178.
- Feitosa F.L.F. 2008. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 2.ed. São Paulo: Roca. 735p.
- Facury Filho E.J., Carvalho A.U., Assis R.A., Lobato F.C.F., Rachid M.A., Carvalho A.A., Ferreira P.M., Nascimento R.A., Fernandes A.A., Vidal J.E. & Uzal F.A. 2009. Clinicopathologic Features of Experimental *Clostridium perfringens* Type D Enterotoxemia in Cattle. Vet Pathol. 46:1213-1220.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 05 março 2012.
- Lobato F.C.F., Moro E., Umehara O., Assis R.A., Martins N.E., Gonçalves L.C.B. 2000. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. Arq Bras Med Vet Zootec. 52:313-318.
- Lobato F.C.F., Salvarani F.M. & Assis R.A. 2007. Clostridioses dos pequenos ruminantes. Rev Port Cienc Vet. 102:23-34.

- Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Gonçalves L.A., Pires P.S., Silva R.O.S., Alves G.G., Neves M., Oliveira Júnior C.A. & Pereira P.L.L. 2013. Clostridioses dos animais de produção. *Vet Zootec.* 20:29-48.
- Luna L.G. 1968. Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ed. New York: Mcgraw Hill.
- Miyashiro S., Nassar A.F.C., Del Fava C., Cabral A.D. & Silva M. 2007. *Clostridium perfringens* types A and D associated with enterotoxemia in an 18- month-old goat. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 13:2:885-893.
- Morris W.E. & Fernández-Miyakawa M.E. 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev Argent Microbiol.* 41:251-260.
- Nogueira Filho A. 2003. Ações de Fomento do Banco do Nordeste e Potencialidades da Caprino-Ovinocultura. In: Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, João Pessoa, PB. Anais... João Pessoa, PB: EMEPA. 43-55.
- Oliveira D.M., Pimentel L.A., Pessoa A.F., Dantas A.F.M., Uzal F.A. & Riet-Correa F. 2010. Focal symmetrical encephalomalacia in a goat. *J Vet Diagn Invest.* 22:793-796.
- Parreiras P.M., Lobato F.C.F., Heneine C.F.L.G.D., Assis R.A., Balsamão G.M. & Nascimento R.A.P. 2002. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 54:3:
- Popoff M.R. & Bouvet P. 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 4:1021-1064.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J., et al. 2007. Doenças de ruminantes e equídeos. 3ª ed. Santa Maria (RS), Pallotti. 1:288-293.
- Sanz M.G., Venturini L., Assis R.A., Uzal F.A., Risso M.A., Idiart J.R. & Perfumo C.J. 2007. Fibrinonecrotic enteritis of piglets in a commercial farm: a postmortem study of the prevalence and the role of lesion associated agents *Isospora suis* and *Clostridium perfringens*. *Pes. Vet Bras.* 27(7):297-300.
- Scholes S.F.E., Welchman D.B., Hutchinson J.P., Edwards G.T. & Mitchell E.S. 2007. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in neonatal lambs. *Vet Rec.* 160: 811-812.
- Shinya L.T., Baccaro M.R. & Moreno A.M. 2006. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *clostridium perfringens* isolated from diarrheic piglets. *Braz J Microbiol.* 37:385-389.
- Smith M.C. & Sherman D.M. 2009. Goat medicine. 2ª ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell. 406-412pp.
- Songer J.G. 1996. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews.* 9:2:216-234.
- Tammemagi L. & Grant K.M. 1967. Vaccination in the control of bovine botulism in Queensland. *Aust Vet J.* 43:368-372.
- Uzal F.A. 2004. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe.* 10:135-143.
- Uzal F.A., Boderio D.A., Kelly W.R. & Nielsen K. 1998. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. *Vet Rec.* 143:17:472-474.
- Uzal F.A., Glastonbury J.R.W., Kelly W.R. & Thomas R. 1997. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet Rec.* 141:224-226.
- Uzal, F.A. & Kelly, W.R. 1996. Enterotoxaemia in goats: a review. *Vet Res Commun.* 20:6: 481-492.
- Uzal F.A., Kelly W.R., Thomas R., Hornitzky M. & Galea F. 2003. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J Vet Diagn Invest.* 15:94-99.
- Uzal F.A., Pasini M.I., Olaechea F.V., Robles C.A. & Elizondo A. 1994. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. *Vet Rec.* 135:279-280.
- Uzal F.A. & Songer J.G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest.* 20:253-265.
- Vaikosen E.S. & Ikhatua U.J. 2005. Detection of high level of enterotoxin of *Clostridium perfringens* types C and D in small ruminants in Nigeria. *Small Rumin Res.* 58:287-290.
- Veschi J.L.A., Dutra I.S., Miyakawa M.E. F., Perri S.H.V. & Uzal F.A. 2006. Immunoprophylactic strategies against enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats. *Pesq Vet Bras* 26(1):51-54.
- Vieira A.A.S., Guedes R.M.C., Salvarani F.M., Silva, R.O.S., Assis, R.A. & Lobato, F.C.F. 2008. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq Inst Biol.* 75:513-516.
- Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y. & Park Y.H. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 35:228-232.

FIGURAS

Figura 1. Intestino delgado com serosa difusamente avermelhada de um caprino que veio a óbito subitamente.

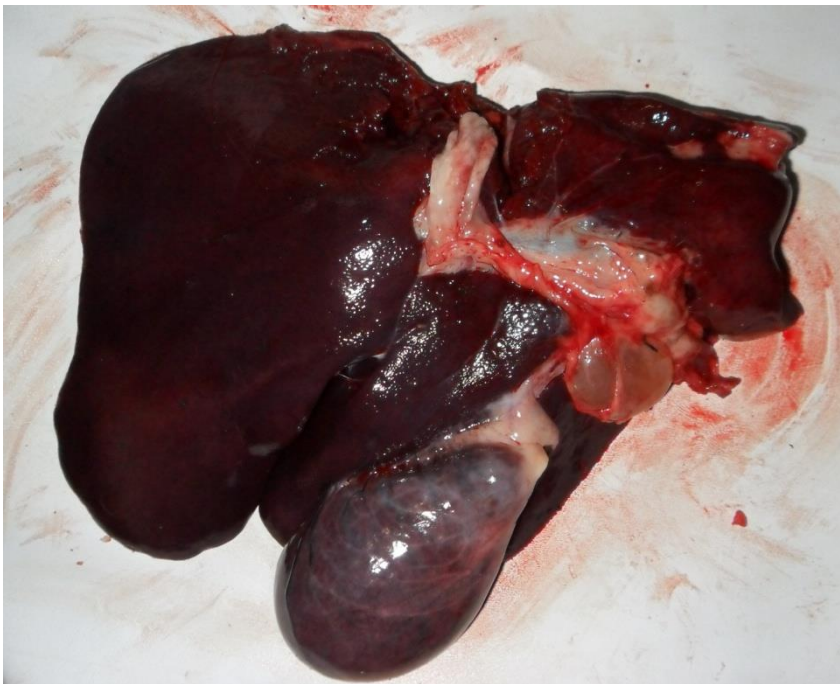


Figura 2. Fígado caprino vermelho-escuro e vesícula biliar dilatada com presença de conteúdo hemorrágico.

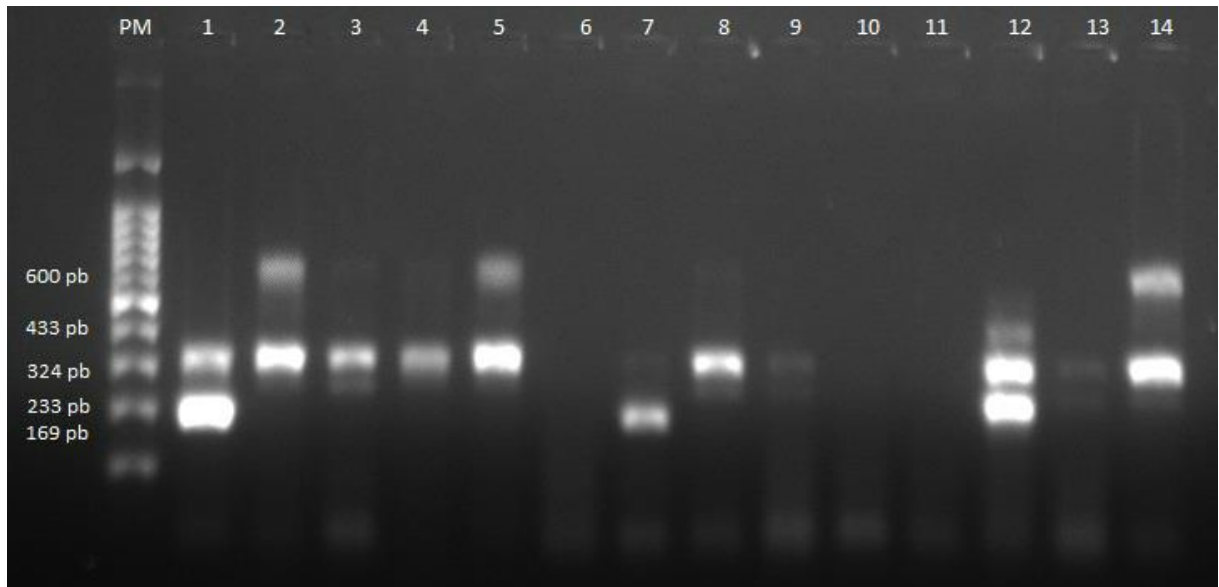


Figura 3. PCR multiplex realizadas em cultura isolada das amostras de fezes, obtidas através de necropsia de animais que vieram a óbito com doença sugestiva de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D, onde 324pb corresponde à toxina alfa; 196pb a toxina beta; 573pb a toxina beta2; 233pb a enterotoxina; 433pb a toxina iota; 600pb a toxina épsilon.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enterotoxemia é uma enfermidade de alta letalidade. Relatos de surtos da doença, com vistas à descrição dos aspectos epidemiológicos, dos sinais clínicos, dos achados de necropsia e do estabelecimento de diagnóstico tanto clínico quanto laboratorial, têm o propósito de informar e alertar veterinários e criadores de caprinos da severidade desta doença. No surto de enterotoxemia relatado, o manejo vacinal realizado era incorreto, aliado ao incremento dos níveis dietéticos de carboidratos, advindos da utilização do manejo pré-estação de monta, denominado *flushing*, e também da melhoria na qualidade das pastagens, decorrente da maior precipitação pluviométrica do período chuvoso. Estes aspectos sanitários e nutricionais devem ser repassados aos criadores de caprinos, com o intuito de ressaltar a sua importância no desencadeamento da enterotoxemia. A genotipagem de micro-organismos causadores de enfermidades é de fundamental importância para a elaboração de vacinas mais específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDASSI, L. et al. Morte súbita de caprinos por enterotoxemia. **Braz J Vet Anim Sci.** 32:109-113. 1995.
- COLODEL, E.M. et al. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesq Vet Bras.** 23(4):173-178. 2003.
- FACURY FILHO, E.J. et al. Clinicopathologic Features of Experimental *Clostridium perfringens* Type D Enterotoxemia in Cattle. **Vet Pathol.** 46:1213–1220. 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 05 março 2012.
- LEITE, E.R.; SIMPLÍCIO, A.A. EMBRAPA CAPRINOS. Importância Econômica da Produção de Caprinos e Ovinos no Nordeste Brasileiro Sistemas de Produção. Dez/2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/CaprinoseOvinosdeCorte/CaprinosOvinosCorteNEBrasil/importancia.htm>>. Acesso em: 23 janeiro 2014.
- LOBATO F.C.F. et al. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arq Bras Med Vet Zootec.** 52:4:313–318. 2000.
- LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; ASSIS, R.A. Clostridioses dos pequenos ruminantes. **Rev Port Cienc Vet.** 102:23-34. 2007.
- LOBATO, F.C.F. et al. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. **Vaccine.** 28:6125–6127. 2010.
- MIYASHIRO, S. et al. *Clostridium perfringens* types A and D associated with enterotoxemia in an 18- month-old goat. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 13:2:885-893. 2007.
- MORRIS, W.E.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Toxinas de *Clostridium perfringens*. **Rev Argent Microbiol.** 41:251-260. 2009.
- NOGUEIRA FILHO, A. Ações de Fomento do Banco do Nordeste e Potencialidades da Caprino-Ovinocultura. In: Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA. 43-55. 2003.

- OLIVEIRA, D.M. et al. Focal symmetrical encephalomalacia in a goat. **J Vet Diagn Invest.** 22:793-796. 2010.
- POPOFF, M.R.; BOUVET, P. Clostridial toxins. **Future Microbiol.** 4:1021-1064. 2009.
- RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equídeos.** 3ª ed. Santa Maria (RS): Pallotti. 288-293. 2007.
- SCHOLES, S.F.E., et al. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in neonatal lambs. **Vet Rec.** 160: 811-812. 2007.
- SILVA, H.W.; GUIMARÃES, C.R.B.; OLIVEIRA, T.S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **RBAS.** 2:2:121-125, Dezembro, 2012.
- SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. **Goat medicine.** 2ª ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell. 406-412. 2009.
- SONGER, J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. **Clin Microbiol Rev.** 9:2:216–234. 1996.
- UZAL F.A., et al. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. **Vet Rec.** 135:279-280. 1994.
- UZAL F.A., et al. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. **Vet Rec.** 141:224-226. 1997.
- UZAL F.A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe.* 10:135–143. 2004.
- UZAL, F.A.; KELLY, W.R. Enterotoxaemia in goats: a review. **Vet Res Commun.** 20:6: 481-492. 1996.
- UZAL F.A.; SONGER J.G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **J Vet Diagn Invest.** 20:253-265. 2008.
- VAIKOSEN E.S.; IKHATUA U.J. Detection of high level of enterotoxin of *Clostridium perfringens* types C and D in small ruminants in Nigeria. **Small Rumin Res.** 58:287–290. 2005.
- VIEIRA A.A.S., et al. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. **Arq Inst Biol.** 75:513-516. 2008.
- YOO H.S., et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by Multiplex PCR. **J Clin Microbiol.** 35:228-232. 1997.