

Comunicação

[Communication]

Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo

[*Clostridium perfringens* type A diarrhea in suckling piglets in industrial swine farms in the states of Minas Gerais and São Paulo]

G.M. Costa¹, R.A. Assis², F.C.F. Lobato², V.L.V. Abreu², J.L. Santos³, F.A. Uzal⁴

¹Departamento de Medicina Veterinária-UFLA
Caixa Postal 37

37200-000 – Lavras, MG

²Escola de Veterinária da UFMG – Belo Horizonte

³Escola de Veterinária da UFV - Viçosa

⁴California Animal Health and Food Safety Laboratory System-San Bernardino, CA

As infecções intestinais de natureza bacteriana são as mais comuns e economicamente mais importantes doenças que acometem os suínos em todo o mundo (Moxley, Duhamel, 1999). Dentre os agentes bacterianos, *Clostridium perfringens* é um dos mais amplamente disseminados, sendo considerado um microrganismo ubíquo e, certamente, um dos principais agentes envolvidos nesses processos, determinando grandes prejuízos econômicos (Songer, 1996).

C. perfringens foi classificado em cinco tipos toxigênicos (A-E) de acordo com as toxinas principais produzidas (alfa, beta, épsilon e iota) (Niilo, 1980). Os tipos toxigênicos A e C são os mais comumente relatados nos processos enteropatogênicos em suínos lactentes (Songer, 1996; Yoo et al., 1997; Klassen et al., 1999).

As alterações clínicas observadas nos casos de envolvimento do *C. perfringens* tipo A (CPA) estão relacionadas com a ação de duas toxinas principais denominadas alfa e enterotoxina (Gyles, Thoen, 1993; Taylor, 1999). A toxina alfa é uma fosfolipase cuja ação patogênica se baseia na lise de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais, musculares e enterócitos, com ação necrótica potencialmente letal. A enterotoxina, que é liberada no momento de esporulação das

bactérias, tem sua ação relacionada com a formação de poros nos enterócitos, inibição da síntese de macromoléculas, desintegração do citoesqueleto e lise celular. A ação dessas toxinas leva à alteração da permeabilidade intestinal, ocasionando o acúmulo de líquidos, diarréia, desidratação e, freqüentemente, mortes súbitas (Niilo, 1980; Okewole et al., 1991; Gyles, Thoen, 1993; Songer, 1996; Taylor, 1999).

Quadros de enterotoxemia sugestivos do envolvimento de *C. perfringens* foram observados em suínos lactentes em três criatórios, o que justificou a realização deste trabalho.

Os rebanhos, três granjas industriais localizadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo, apresentavam elevada incidência de diarréia em leitões lactentes. A doença caracterizava-se por altas morbidade e mortalidade, acometendo desde recém-nascidos até leitões com aproximadamente três semanas de idade. Clinicamente, os animais acometidos apresentavam fezes diarréicas de coloração esbranquiçada, apáticos e com baixa taxa de crescimento.

Recebido para publicação em 21 de julho de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 29 de setembro de 2003

E-mail gmcosta@ufla.br

Para o diagnóstico, foram sacrificados e submetidos à necropsia 15 animais clinicamente acometidos (cinco de cada propriedade). Porções do duodeno que apresentavam alterações macroscópicas foram remetidas sob refrigeração à Escola de Veterinária da UFMG para exames bacteriológicos. Amostras de fezes de outros animais clinicamente acometidos também foram coletadas nas propriedades para exames parasitológicos, recebendo o mesmo tratamento que as anteriores. Os exames parasitológicos foram realizados segundo Martins (1984) e visavam a pesquisa de *Isospora suis*.

Na tentativa de isolamento do *C. perfringens*, foram examinadas 15 amostras de conteúdo duodenal (uma/animal acometido). Aliquotas de 100µl dos espécimes clínicos foram assepticamente diluídas em 0,5ml de solução salina estéril a 0,85%, a partir das quais foram confeccionados esfregaços corados pela técnica de Gram. A semeadura foi feita em ágar sangue contendo 10% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose de acordo com Sterne e Batty (1975).

Adicionalmente, as amostras foram assepticamente semeadas em tubos de ensaio contendo o meio de Tarozzi (Bier, 1985) e incubadas por 48 horas à 37°C. O crescimento foi avaliado por meio da presença de depósito no fundo dos tubos, turbidez e produção de gás. Esfregaços desses cultivos foram corados pela técnica de Gram e, posteriormente, alíquotas foram subcultivadas em placas de ágar sangue nas mesmas condições descritas anteriormente.

Decorrido o tempo de incubação, colônias sugestivas de serem *C. perfringens*, que apresentavam duplo halo de hemólise e aspecto umbilicado, foram isoladas em meio de Tarozzi e submetidas a testes bioquímicos de acordo Sterne e Batty (1975).

Filtrados sugestivos de serem *C. perfringens* foram obtidos a partir dos cultivos em caldo Tarozzi usando membrana de Millipore de 0,22µm. Eles foram utilizados com o objetivo de tipificar o *C. perfringens*. Para isso, foi empregada a técnica de intradermoreação em cobaias (IC) segundo Sterne e Batty (1975).

Realizou-se, ainda, a partir de colônias sugestivas de *C. perfringens*, uma técnica de PCR segundo Uzal et al. (1997), visando amplificar os segmentos gênicos específicos que codificam a alfa, beta, épsilon e iota toxinas de *C. perfringens*.

À necropsia constatou-se emaciação, congestão e presença de enterite hemorrágica ao longo de todo o intestino delgado, e intensa produção de gases, achados que, juntamente com o quadro clínico, foram bastante sugestivos de enterotoxemia por *C. perfringens* (Johannsen et al., 1993; Taylor, 1999). As amostras de fezes submetidas a exames para diagnóstico de isosporose apresentaram resultados negativos, descartado-se a possibilidade de envolvimento de *I. suis* nas patologias observadas.

O cultivo dos 15 conteúdos duodenais em ágar sangue resultou predominantemente no crescimento de colônias grandes, apresentando duplo halo de hemólise e aspecto umbilicado, características de *C. perfringens*. Profuso crescimento foi observado nos tubos de meio de Tarozzi. Aliquotas desses tubos subcultivadas anaerobicamente em ágar sangue resultaram no crescimento de colônias idênticas àquelas isoladas a partir da semeadura direta do conteúdo duodenal em ágar sangue. O exame microscópico, a partir de esfregaços corados pelo Gram, revelou presença maciça de bastonetes Gram positivos curtos, grossos, não esporulados, alguns em cadeia, sugerindo tratar-se de *C. perfringens*. Por meio de testes bioquímicos, os cultivos foram identificados como *C. perfringens*. Pela IC e PCR (Fig.1) foram todos tipificados como *C. perfringens* tipo A.

A utilização da técnica de PCR confirmou os resultados obtidos na prova de IC, demonstrando ser útil na determinação do tipo de *C. perfringens*, possibilitando reduzir o uso de testes bioquímicos que, em geral, são laboriosos e apresentam resultados duvidosos. Outra vantagem da PCR em relação aos métodos convencionais é a sua maior sensibilidade e o fato de dispensar o uso de animais para detecção de toxinas, resolvendo problemas bioéticos (Bartholomew et al., 1995; Uzal et al., 1997).

Diarréia em leitões lactentes...

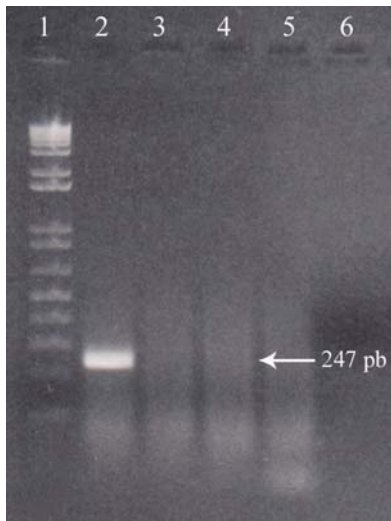


Figura 1. Amostra de *Clostridium perfringens* tipo A do presente estudo. Eletroforese em gel de Agarose. Canaleta1: (marcador de peso molecular, 1Kb Plus DNA Ladder). Canaletas 2, 3, 4 e 5: amplificação do gene da toxina alfa, beta, épsilon e iota do *Clostridium perfringens*, respectivamente. Canaleta 6: controle negativo.

Não foi realizado exame histopatológico do quadro de enterite hemorrágica, que seria de grande valia para se correlacionarem as lesões microscópicas com o quadro clínico-patológico e os resultados de laboratório. Entretanto, os resultados bacteriológicos, toxicológicos (IC) e a técnica de PCR permitiram confirmar a ocorrência de enterotoxemia por CPA. Contudo, estes achados devem ser interpretados com cautela, uma vez que o *C. perfringens* é uma bactéria pertencente à microbiota normal de suínos (Taylor, 1999). Após a morte do animal, ela se multiplica rapidamente, invadindo a mucosa e a submucosa intestinal, de onde se dissemina para todos os tecidos. Por esse motivo, esses testes somente são confiáveis se realizados logo após a morte ou o sacrifício do animal.

Desse modo, para se ter um diagnóstico seguro, é preciso considerar, além dos resultados bacteriológicos e toxicológicos, os dados clínicos, epidemiológicos e patológicos (Niilo, 1980; Taylor, 1999). Com base nesses achados, foi possível adotar medidas específicas de controle do problema. Elas normalmente estão centradas na melhoria do fornecimento de colostro, na higiene da maternidade e no fornecimento de antibióticos (Taylor, 1999).

Este relato parece ser o primeiro sobre o envolvimento do CPA em enterites de leitões no Brasil.

Palavras-chave: leitão, *Clostridium perfringens* tipo A, enterotoxemia, isolamento, PCR intradermorreação

ABSTRACT

Diarrhea in suckling piglets caused by Clostridium perfringens type A was diagnosed in industrial (technified) swine farms of the states of Minas Gerais and São Paulo (Brazil), based on isolation and identification of bacterium by biochemical tests, detection of alpha toxin in animal bioassays, and PCR. This seems to be the first report of clostridial enterotoxaemia in piglets by C. perfringens type A in Brazil and allowed specific procedures to control the disease.

Keywords: piglet, Clostridium perfringens type A, enterotoxaemia, isolation, intradermic reaction, PCR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTHOLOMEW, B.A.; STRINGER, M.F.; WATSON, G.N. et al. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J. Clin. Pathol.*, v.38, p.222-228, 1995.
- BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- GYLES, C.L.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2.ed. Ames: Iowa State University, 1993. 331p.
- JOHANNSEN, U.; ARNOLD, S.; KOEHLER, B. et al. Studies in experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia of suckled piglets: Experimental provocation of the disease by experimental *Clostridium perfringens* type A intoxication and infection: Experimental Approach: Clinical manifestation: Histological findings. *Monatshefte-fur-Veterinarmedizin*, v.48, p.129-136, 1993.
- KLAASEN, H.L.; MOLKENBOER, M.J.; BAKKER, J. et al. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *Immunol. Med. Microbiol.*, v.24, p.325-332, 1999.
- MARTINS, N.E. *Determinação de alguns aspectos das condições zoo-sanitárias e da infecção por coccídios em suínos na micro-região homogênea da Zona da Mata de Ponte Nova, Minas Gerais*. 1984. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOXLEY, R.A.; DUHAMEL, G.E. Comparative pathology of bacterial enteric disease of swine. *Adv. Exper. Med. Biol.*, v.473, p.83-101, 1999.
- NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease. A review of current knowledge. *Can. Vet. J.*, v.21, p.141-148, 1980.
- OKEWOLE, P.A.; ITODO, A.E.; OYETUDE, L.L. et al. *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in pigs. A report of five cases. *Br. Vet. J.*, v.147, p.484-485, 1991.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric disease of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, p.216-34, 1996.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic Clostridia*. London: Butterworth, 1975. 139p.
- TAYLOR, D.J. Clostridial Infections. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. et al. *Diseases of swine*. 8.ed. Ames: Iowa State University, 1999. p.395-412.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L. et al. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.25, p.339-344, 1997.
- YOO, H.S.; LEE, S.U.; PARK, K.Y. et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of clostridium perfringens types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.228-232, 1997.