

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

MIONECROSES CLOSTRIDIAIS BOVINAS

R.A. de Assis¹, F.C.F. Lobato¹, R.A.P. Nascimento¹, F. Maboni²,
P.S. Pires², R.O.S. Silva², F.M. Salvarani², A.P.C. de Vargas²

¹Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Setor de clostridioses, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Av. Rômulo Joviano s/nº, CEP 33600-000, Pedro Leopoldo, MG, Brasil. E-mail: ronnieassis@gmail.com

RESUMO

As mionecroses são enfermidades altamente fatais, representadas pelo carbúnculo sintomático e edema maligno. Com o objetivo de determinar a ocorrência dos diferentes clostrídios envolvidos nas mionecroses em bovinos no Brasil, foi realizado um estudo retrospectivo a partir de 30 casos suspeitos de carbúnculo sintomático e edema maligno. Empregou-se a técnica de estreptavidina biotina peroxidase em tecidos de bovinos fixados em formol e incluídos em parafina de arquivos de patologia de diferentes estados do país. Foram detectados 21 *Clostridium chauvoei* (70%), cinco *Clostridium septicum* (17%), seguidos de dois *C. chauvoei* associado ao *C. septicum* (7%), um *C. chauvoei* mais *Clostridium sordellii* (3%) e um *C. chauvoei* mais *Clostridium novyi* tipo A (3%). Este é o primeiro diagnóstico de *C. novyi* tipo A no Brasil, e o primeiro relato da ocorrência de *C. chauvoei* associado à lesão no miocárdio. Os achados da maior ocorrência de *C. chauvoei* e *C. septicum* corroboram com estudos anteriores no país. Estes dados sobre a ocorrência dos agentes responsáveis pelas mionecroses em diferentes estados do país são de extrema importância frente às decisões relativas ao controle dessas enfermidades.

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico, clostrídios, edema maligno, carbúnculo sintomático.

ABSTRACT

BOVINE CLOSTRIDIAL MYONECROSIS. Clostridial myonecroses are highly fatal diseases, characterized by black leg and malignant oedema. In order to determine the occurrence of the different agents involved in Brazilian clostridial myonecrosis, a retrospective study was conducted concerning 30 suspected cases of blackleg and gas gangrene using a streptavidin-biotin peroxidase technique in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle from the archives of pathology of different states of Brazil. The clostridia predominantly detected were *Clostridium chauvoei* (70%), followed by *Clostridium septicum* (5 cases or 17%), *C. chauvoei* plus *C. septicum* (2 cases or 7%), *C. chauvoei* plus *Clostridium sordellii* (1 case or 3%), *C. chauvoei* plus *Clostridium novyi* type A (1 case or 3%). This is the first diagnosis of *C. novyi* type A in Brazil. The findings of the higher occurrence of *C. chauvoei* and *C. septicum* concur with previous works in Brazil. This article also includes the first report in Brazil of the occurrence of *C. chauvoei* associated with a lesion in the myocardium. Thus, this study supplies important data about the occurrence of the agents responsible for clostridial myonecrosis in different states of Brazil, these data being important for decisions relative to control of these diseases.

KEY WORDS: Diagnosis, clostridia, malignant oedema, black leg.

Mionecroses são enfermidades altamente fatais representadas pelo carbúnculo sintomático e pelo edema maligno, em ruminantes e outras espécies animais. O carbúnculo sintomático é considerado uma doença "endógena" para bovinos e, na maioria dos casos, "exógena" para ovinos, sendo que em ambas as espécies é causado pelo *Clostridium chauvoei*. Em contraste, o edema maligno é uma doença

"exógena" causada por um ou mais dos seguintes micro-organismos: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novyi* tipo A e *C. perfringens* tipo A. Os *C. chauvoei* e *C. septicum* atuam tanto de forma combinada como isolada e são considerados os principais agentes responsáveis pelas mionecroses (SASAKI *et al.*, 2002). Apesar do grande número de casos, a maioria dos diagnósticos é realizado apenas com base nos acha-

²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Santa Maria, RS, Brasil.

dos clínicos e de necropsia, com informações etiológicas escassas (CORREA *et al.*, 1980; ASSIS *et al.*, 2002). A identificação do agente tem sido baseada no isolamento e nas características morfológicas e bioquímicas. Entretanto, esses procedimentos são laboriosos, demorados (levam em torno de quatro dias a uma semana para se completar), requerem pessoal treinado e podem incorrer a resultados imprecisos (ASSIS *et al.*, 2001). Nesse sentido, a técnica de imunohistoquímica empregando o complexo imunoenzimático estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) torna-se uma ferramenta útil para detecção dos agentes envolvidos nas mionecroses em amostras clínicas parafinadas (UZAL *et al.*, 2003; ASSIS *et al.*, 2005).

Com o intuito de determinar os agentes clostridiais envolvidos nos quadros de mionecroses no Brasil, no presente trabalho foi realizado um estudo retrospectivo em 30 casos de origem bovina e com suspeita clínica, pertencentes a diferentes arquivos de patologia do país, pela técnica de SBP.

Foram avaliadas 49 amostras, provenientes de 30 animais com suspeita de mionecroses pelos achados de necropsia. O material analisado teve origem de diferentes arquivos de patologia de cinco estados do país (MG, 19; RS, 5; RJ, 3; MT, 2; MS, 1). As informações epidemiológicas disponíveis dos casos estudados estão apresentadas na Tabela 1. Para a realização deste estudo, diferentes tipos de amostras foram analisadas, sendo principalmente músculo esquelético (27), além de amostras de fígado (9), baço (7), miocárdio (3) e rim (3).

Submeteu-se as amostras clínicas parafinadas à avaliação pela técnica de estreptavidina-biotina peroxidase (SBP), conforme ASSIS *et al.* (2005), usando anticorpos policlonais, produzidos em coelhos para a detecção específica de *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. novyi* tipo A. As secções avaliadas pela técnica foram previamente montadas em Silane (Sigma, St. Louis, EUA).

Para avaliação do padrão de distribuição e as quantidades dos clostrídios detectados nos diferentes órgãos examinados foram utilizados os seguintes escores: +5 alta quantidade de bastonetes; +3 média quantidade e +1 pequena quantidade.

Os resultados dos clostrídios identificados pela técnica estreptavidina-biotina peroxidase (SBP), nos 30 casos de mionecroses em bovinos pesquisados nos 49 órgãos, estão apresentados na Tabela 1.

Detectou-se *C. chauvoei* em 21 casos (70%), *C. septicum* em cinco (17%), *C. chauvoei* associado ao *C. septicum* em dois (7%), *C. chauvoei* associado ao *C. sordellii* em um caso (3%) e *C. chauvoei* associado ao *C. novyi* tipo A em um caso (3%). O padrão de distribuição e as quantidades dos clostrídios detectados nos diferentes órgãos examinados pela técnica de SBP (Tabela 1) foram mais abundantes no músculo

esquelético: escore +5; seguido do fígado e miocárdio com escore +3 e no baço e rim com escore +1 – resultados semelhantes aos descritos por ASSIS *et al.* (2005). A ampla distribuição de *C. chauvoei* e *C. septicum* em casos de mionecroses já foi relatada no Brasil (CORREA *et al.*, 1980; BALDASSI *et al.*, 1985), Inglaterra (WILLIAMS, 1977) e por SASAKI *et al.*, (2002) no Japão.

No músculo esquelético, em todos os casos em que foi examinado, observou-se elevada concentração de bastonetes (Tabela 1), reforçando a ideia de ser o músculo esquelético o material de eleição para a detecção desses. Os achados de *C. chauvoei* e *C. septicum* em outros órgãos, e não somente no músculo esquelético (casos 8563, 8273, 17447, 439, 185, 316, 329, 21, 235, 20194, 9764, 8571, 1811 e 688), foram também relatados por ASSIS *et al.* (2005). Esses achados, em parte, confirmam que outros órgãos também podem ser usados na rotina do diagnóstico laboratorial das mionecroses pela técnica de SBP.

Nos demais 16 casos envolvendo *C. chauvoei* e *C. septicum* detectados separadamente e restritos apenas ao músculo esquelético (Tabela 1), grande número de bastonetes desses micro-organismos foram detectados (escore +5) pela técnica de SBP. A presença de *C. chauvoei* nos casos 235, 329 e 17447, envolvendo lesão no miocárdio, caracteriza o carbúnculo sintomático visceral, sendo os primeiros relatados no Brasil. Essa forma de apresentação da doença é raramente descrita, ocorrendo principalmente em animais jovens, como foi observado neste trabalho. UZAL *et al.* (2003), relataram um surto de miocardite por *C. chauvoei* em bezerras na Patagônia, Argentina. Mais recentemente, no Brasil, MIYASHIRO *et al.* (2007) detectaram *C. chauvoei* em amostras de músculos, fígado e metatarso, de sete bovinos acometidos pelo carbúnculo sintomático.

Dentre os 19 casos com informações de idade, em 15 (84%) foram identificados o *C. chauvoei* e todos tinham até dois anos de idade (Tabela 1). Este dado corrobora com as informações sobre a ocorrência de infecção pelo *C. chauvoei* em animais jovens, entre seis meses a dois anos, podendo eventualmente acometer animais ainda mais novos (GREGORY *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2006).

O relato da detecção de *C. chauvoei* associado ao *C. sordellii* em bovinos é o primeiro na literatura nacional. Recentemente, *C. sordellii* foi o agente responsável por um surto de edema maligno em ovinos no Brasil (COSTA *et al.*, 2007). Neste caso, o diagnóstico foi baseado no isolamento a partir de material refrigerado, bem como pela imunofluorescência direta. *C. sordellii* já foi relatado no Brasil em associação ao *C. perfringens* por CORREA *et al.* (1980).

O achado de *C. novyi* tipo A, associado ao *C. chauvoei* encontrado neste trabalho, no caso 9844, é o primeiro relatado no país. De acordo com o histórico do caso, o animal era jovem e foi necropsiado três

horas após a morte sendo encontrada uma grande quantidade (escore 5) de bastonetes de ambos agentes (Tabela 1). Assim, este parece ser um relato inédito na literatura brasileira da associação entre *C. novyi* tipo A e *C. chauvoei* em bovinos, embora essa condição tenha sido descrita por MORRIS *et al.* (2002) na espécie ovina.

Grande parte dos casos avaliados apresentava históricos incompletos, com raras informações das condições *post mortem* e dos quadros clínicos. Essa situação, de dados escassos, é relatada pela maioria

dos pesquisadores e laboratoristas (CORREA *et al.*, 1980; ASSIS *et al.*, 2002). No entanto, a ampla caracterização clínica e de necropsia é de grande importância para o diagnóstico final. Na diferenciação, por exemplo, do edema maligno e carbúnculo sintomático, é relevante a presença de feridas externas, pelo caráter vulneroinfeccioso da primeira enfermidade. Com a obtenção desses dados complementares, o prognóstico para o restante do rebanho, além da tomada de decisões pelos profissionais da área pode ser mais adequado.

Tabela 1 - Resultados da prova de SBP (estreptavidina-biotina peroxidase) realizada em órgãos de casos de mionecroses bovinas entre 1936 a 2003.

Caso	Órgão ¹	Idade	Resultados da SBP (Escore) ²	Estado	Ano
7	Músculo	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1936
266	Músculo	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1940
688	Baço	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+1)		1942
1480	Músculo	1 ano	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1947
1811	Músculo e baço	3 anos	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+1)		1949
3999	Músculo	NF*	<i>C. septicum</i> (+5)		1958
8571	Músculo e fígado	1 ano	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3) / <i>C. septicum</i> (+5) (+3)	MG	1967
8273	Músculo, fígado e baço	5 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3) (+1)		1967
8563	Músculo, fígado, baço e rim	4 anos	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3) (+1) (+1) / <i>C. septicum</i> (+5) (+3) (+1) (+1)		1967
9764	Músculo e rim	8 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+1)		1969
9844	Músculo	6 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) / <i>C. novyi</i> tipo A (+5)		1969
14299	Músculo	4-5 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) / <i>C. sordellii</i> (+1)		1974
1974	Músculo	8 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5)	RJ	1979
17447	Miocárdio, fígado e baço	15 meses	<i>C. chauvoei</i> (+3) (+3) (+1)	MG	1980
2158	Músculo	1 ano	<i>C. chauvoei</i> (+5)	RJ	1980
2390	Músculo	6 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1980
20194	Fígado e baço	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+3) (+1)		1989
86	Músculo	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1999
185	Músculo e fígado	10 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3)	MG	1999
222	Músculo	1 ano	<i>C. chauvoei</i> (+5)		1999
439	Músculo, fígado, baço e rim	7 meses	<i>C. septicum</i> (+5) (+3) (+1) (+1)		2001
21	Músculo e fígado	8 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3)		2003
229	Músculo	3 anos	<i>C. chauvoei</i> (+5)		2003
235	Músculo e miocárdio	7 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3)	RS	2003
316	Músculo e fígado	NF*	<i>C. septicum</i> (+5) (+3)		NF*
329	Músculo e miocárdio	4 meses	<i>C. chauvoei</i> (+5) (+3)		2003
2546	Músculo	NF*	<i>C. septicum</i> (+5)	MG	NF*
N140-00	Músculo	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+5)	MT	NF*
187-00	Músculo	NF*	<i>C. septicum</i> (+5)		NF*
03R-B	Músculo	NF*	<i>C. chauvoei</i> (+5)	MS	NF*

*NF=Dados não fornecidos.

¹Músculo = Músculo esquelético.

²+5 = alta quantidade de bastonetes; +3= média quantidade de bastonetes; +1= pequena quantidade de bastonetes.

Apesar da baixa casuística estudada (30 casos), verificou-se neste estudo que os *C. chauvoeie C. septicum* foram os agentes mais frequentes de mionecroses, corroborando com as descrições de CORREA *et al.* (1980); BALDASSI *et al.* (1985) e SASAKI *et al.* (2002). Entretanto, para se saber a real prevalência dos clostrídios no nosso meio, é necessário realizar um levantamento em todos os estados brasileiros, pois essa informação será extremamente útil para a tomada de decisões relativas à composição antigênica das vacinas.

Este estudo demonstra que *C. chauvoeie C. septicum* são os agentes mais relacionados às mionecroses em bovinos no Brasil. A técnica de estreptavidina-biotina peroxidase (SBP) é eficiente para a determinação da etiologia dos casos de mionecroses a partir de amostras de músculo esquelético, rim, fígado e miocárdio de animais. Dados atuais sobre a ocorrência dos agentes responsáveis pelas mionecroses em bovinos de diferentes regiões do país são de extrema importância frente às decisões de controle dessas enfermidades.

AGRADECIMENTOS

À Fapemig e ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG, Pedro Leopoldo), pela concessão de suas dependências para realização desse experimento.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, R.A.; LOBAT, F.C.F.; DIAS, L.D.; UZAL, F.A.; MARTINS, N.E.; SILVA, N. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Revista de Medicina Veterinária*, v.82, n.2, p.68-70, 2001.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.E.; NASCIMENTO, R.A.P.; ABREU, V.L.V.; UZAL, F.A. An outbreak of malignant edema in cattle. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, n.543, p.143-145, 2002.
- ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; SARAKIDES, R.; SANTOS, R.L.; DIAS G.R.C.; NASCIMENTO, R.A.P.; ABREU, V.L.V.; UZAL, F.A.; PERREIRAS, P.M. Immunohistochemical detection of Clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, p.4-8, 2005.
- BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; CALIL, E.M.B.; CHIBA, S.; MOULIN, A.A.P. Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-79, no estado de São Paulo. *Biológico*, São Paulo, v.51, p.161-165, 1985.
- CORREA, W.M.; CORREA, C.N.N.; LOPES, C.A.M.; LANGONI, H.; MODOLO, J.F. Enfermidades por clostrídios 1969-1978. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.32, p.369-374, 1980.
- COSTA, J.L.N.; OLIVEIRA, M.M.D.; LOBATO, F.C.F.; SOUZA, M.F.; MARTINS, N.E.; CARVALHO, A.V.A.; FACURY FILHO, E.J.; ABREU, V.L.V.; ASSIS, R.A.; UZAL, F.A. Outbreak of malignant oedema in sheep caused by *Clostridium sordelii*, predisposed by routine vaccination. *Veterinary Record*, v.160, p.594-595, 2007.
- GREGORY, L.; DELLA LIBERA, A.M.M.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; POGLIANI, F.C.; BIRGEL, D.B.; BENESI, F.J.; MIYASHIRO, S.; BALDASSI, L. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de "Manqueira". *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.73, n.2, p.243-246, 2006.
- MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; SOUZA, M.C.A.M.; CARVALHO, J.B.; ADEGAS, J.E.B. Identification of *Clostridium chauvoei* in clinical samples cultures from blackleg cases by means of PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 491-493, 2007.
- MIRANDA, A.; FORT, M.; CARLONI, G.; CERVIÑO, M.; BEDOTTI, D. Evaluación de la respuesta serológica de vacunas comerciales frente *Clostridium chauvoei*. *Veterinaria Argentina*, v.23, p. 20-26, 2006.
- MORRIS, W.E.; UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M. Malignant oedema associated with navel infection in a Merino lamb. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, p.448-449, 2002.
- UZAL, F.A.; PARAMIDANI, M.; ASSIS, R.; MORRIS, W.; MIYAKAWA, M.F. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. *Veterinary Record*, v.152, p.134-136, 2003.
- SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H.; OGIKUBO Y.; TAKIKAWA, N.; TAMURA Y. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.257-267, 2002.
- WILLIAMS, B.M. Clostridial myositis in cattle: bacteriology and gross pathology. *Veterinary Record*, v.100, p.90-91, 1977.

Recebido em 6/3/08
Aceito em 21/4/10