

CLOSTRIDIOSES DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Francisco Carlos Faria Lobato¹
Felipe Masiero Salvarani¹
Luciana Aramuni Gonçalves¹
Prhiscylla Sadanã Pires¹
Rodrigo Otávio Silveira Silva¹
Guilherme Guerra Alves¹
Monique Neves¹
Carlos Augusto de Oliveira Júnior¹
Pedro Lúcio Lithg Pereira¹

RESUMO

As bactérias do gênero *Clostridium* 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. Esta revisão tem como objetivo abordar as principais clostridioses que acometem os animais domésticos no Brasil, abordando os principais aspectos e ocorrência do botulismo, tétano, mionecroses (gangrena gasosa e carbúnculo sintomático), doenças causadas por *C. perfringens* e diarreias e colites causadas por *C. difficile*.

Palavras-chave: diarreia, mionecrose, enterotoxemia, botulismo, tétano.

CLOSTRIDIAL INFECTION IN FARM ANIMALS

ABSTRACT

Bacteria from genus *Clostridium* are rod, Gram-positive and anaerobic bacteria. Clostridial infections are considered one of the most important group of diseases of domestic animals, mainly in ruminants. Most pathogenic clostridial species are able to sporulate and has a marked dissemination in the environment, making infections and poisoning by these bacteria virtually impossible to eradicate. The aim of this review is to describe main clostridial diseases from domestic animals in Brazil, focusing in main features and occurrence of botulism, tetanus, myonecrosis (gas gangrene and blackleg), diseases by *C. perfringens* and diarrhea and colitis caused by *C. difficile*.

Keywords: diarrhea, myonecrosis, enterotoxemia botulism, tetanus.

ENFERMEZAS CLOSTRIDIALES DE ANIMALES DE GRANJA

RESUMEN

Las bacterias del género *Clostridium* son bastonetes, Gram positivos, anaeróbicos. Debido a la alta capacidad de esporulación de la mayoría de microorganismos pertenecientes a este grupo, las infecciones e intoxicaciones por bacterias del género *Clostridium*, conocidas como

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, campus Pampulha da UFMG, 30123-970. Belo Horizonte, MG flobato@vet.ufmg.br

clostridiosis, son difícil de erradicar y se encuentran entre las principales enfermedades que afectan los animales domésticos en todo el mundo, principalmente en rumiantes. Esta revisión tiene como objetivo abordar las principales clostridiosis que afectan los animales domésticos en Brasil, enfocando aspectos básicos y ocurrencia de botulismo, tétano, mionecrosis (gangrena gaseosa y carbunco sintomático), enfermedades causadas por *C. perfringens*, diarreas y colitis por *C. difficile*.

Palabras clave: diarrea, mionecrosis, enterotoxemia, botulismo, tétanos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* foi primeiramente descrito por A. Prazmowski em 1880 e desde então foram identificadas mais de 225 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas. *Clostridium* spp. são bastonetes Gram-positivo, esporulados e anaeróbios estritos, sendo a maioria constituinte da microbiota intestinal de animais e seres humanos, porém apenas algumas espécies são capazes de causar enfermidades nos animais.

Muitos dos processos infecciosos e intoxicações que afetam os animais domésticos são causados por bactérias do gênero *Clostridium*. Estas doenças são chamadas de clostridioses, e possuem altas taxas de letalidade. Devido à alta capacidade de esporulação, as bactérias desse gênero são capazes de se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana. Mesmo sendo capazes de produzir doença em animais e seres humanos, são raramente considerados agentes zoonóticos.

As bactérias patogênicas que compõem este gênero causam doenças basicamente por dois mecanismos: produção de toxinas e invasão de tecidos. Os clostrídios penetram no organismo na forma esporulada, por meio de alimento contaminado, feridas ou por inalação. As toxinas são produzidas no organismo do animal ou são ingeridas pré-formadas.

Dentre as toxinas de origem clostridial, destacam-se as neurotoxinas botulínicas, tetânica e a toxina épsilon produzida por *C. perfringens* tipo B e D, como as mais potentes toxinas de origem microbiana conhecidas.

As clostridioses estão entre as principais enfermidades que acometem os animais domésticos no país com altas taxas de morbidade e letalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos ao setor produtivo.

Os principais agentes envolvidos e as enfermidades causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium* são apresentadas no quadro 1.

Quadro 1: Principais doenças clostridiais e seus agentes causadores

	DOENÇA	AGENTE CAUSADOR
Doenças Neurotrópicas	Tétano	<i>Clostridium tetani</i>
	Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>
Doenças Hepáticas	Hepatite necrótica Hemoglobinúria bacilar	<i>Clostridium novyi</i> tipo B <i>Clostridium haemolyticum</i>
Doenças causadas por <i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxemia dos Bovinos Adultos Doença do Rim Pulposo Enterotoxemia Hemorrágica	<i>Clostridium perfringens</i> tipos A, B, C, D e E
Mionecroses	Carbúnculo sintomático Gangrena gasosa ou edema maligno	<i>Clostridium chauvoei</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium sordellii</i> <i>Clostridium novyi</i> tipo A <i>Clostridium perfringens</i> tipo A
Diarreias	Colite pseudomembranosa	<i>Clostridium difficile</i>

Esta revisão abrange as principais clostridioses que acometem os animais de produção no Brasil.

CLOSTRIDIOSES

DOENÇAS CAUSADAS POR *Clostridium perfringens*

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. *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A-E), com base na produção de quatro toxinas principais, alfa, beta, épsilon e iota (quadro 2) (1).

Quadro 2: Caracterização das toxinas alfa, beta, épsilon e iota de *C. perfringens*

	Toxina alfa	Toxina beta	Toxina épsilon	Toxina iota
Codificação	Gene <i>plc</i>	Gene <i>cpb</i>	Gene <i>etx</i>	Genes <i>iap</i> e <i>iab</i>
Origem	Cromossomal	Plasmidial	Plasmidial	Plasmidial
Peso molecular (kDa)	43	40	33,7	47,5 e 105
Efeito principal	Hemólise intravascular, danos capilares e agregação plaquetária.	Formação de poros e alteração na permeabilidade vascular.	Alteração na permeabilidade vascular.	Alteração na organização do citoesqueleto celular.

Clostridium perfringens tipo A

Clostridium perfringens tipo A tem sido isolado do intestino de diversas espécies de animais, sendo considerado componente da microbiota normal. Evidências sugerem seu envolvimento na diarreia em leitões lactentes, enterite necrótica em aves e doença do “cordeiro amarelo” em ovinos (2).

Em suínos, a infecção acontece em leitões lactentes com um a quatro dias de vida, que se infectam logo após o nascimento com os esporos presentes no ambiente e nas fezes das porcas. Em um estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos da América, nos anos de 2005 e 2006, *C. perfringens* tipo A foi identificado como o principal agente causador de diarreia neonatal, compreendendo 48% das 273 amostras analisadas (3). No Brasil existem apenas duas publicações relatando o envolvimento deste agente como causador de diarreia neonatal suína, em 2003, por Moreno et al. (4), que isolaram *C. perfringens* tipo A, beta-2 positivo, de leitões de um a cinco dias de idade, de quatro surtos de diarreia neonatal na região Sul do país. E em 2004, Costa et al. (5) isolaram o agente em três rebanhos de granjas comerciais dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A patogenia da infecção envolve a participação da toxina alfa, entretanto existem relatos, que atribuem à toxina beta-2 e não a toxina alfa, como a responsável pela ocorrência de diarreia (6). Os sinais clínicos consistem em diarreia mucóide e pastosa, de coloração amarelada e não hemorrágica, apatia, desidratação e baixa taxa de crescimento. À necropsia, pode ser encontrada hiperemia discreta a moderada da mucosa intestinal e dilatação de alças intestinais devido à produção aumentada de gases e excesso de conteúdo líquido (5). Em geral, as lesões não são muito graves, sejam elas macro ou microscópicas permitindo sugerir que a diarreia que acompanha estes quadros seja do tipo secretória (3).

A enterite necrótica afeta tanto frangos de corte quanto aves silvestres, e, atualmente, além da ação da toxina alfa, tem sido proposto o envolvimento da toxina NetB (7). Diversos fatores predisponentes são conhecidos hoje, entre eles, a ocorrência de doenças concomitantes como coccidiose, o tipo de dieta, estresse e elevada densidade animal. Em granjas comerciais, afeta principalmente animais jovens, entre duas e cinco semanas de idade, e pode ocorrer de maneira aguda ou branda, com mortalidade de até 50%, entretanto, a doença ocorre mais comumente na forma branda, na qual as aves apresentam sinais clínicos inespecíficos com queda no desempenho zootécnico, traduzida por uma taxa de crescimento reduzida e a desuniformidade do lote (8).

A doença do “cordeiro amarelo” é uma enterotoxemia também causada pela ação da toxina alfa e tem sua patogenia baseada na hemólise de eritrócitos com a liberação de hemoglobina. Os animais acometidos apresentam depressão, anemia, icterícia e hemoglobinúria. O curso clínico da doença é de seis a 12 horas, podendo o animal vir a óbito. Uma condição semelhante é descrita em caprinos e bezerros (2).

***Clostridium perfringens* tipo B**

É o agente causador da disenteria em cordeiros recém nascidos, podendo afetar também caprinos, bezerros e potros. Esta afecção acomete cordeiros com menos de duas semanas de idade e é causada principalmente pela ação da toxina beta, que é inativada por enzimas proteolíticas, como a tripsina. O fato de a doença ocorrer primariamente em animais recém nascidos advém do excesso de colostragem, por ser o colostro fonte de fatores antitripsínicos, favorecendo assim a ação da toxina. A doença apresenta morbidade em torno de 30%, com letalidade podendo atingir 100% dos animais acometidos. O curso é superagudo, em geral em poucas horas os animais apresentam fortes dores abdominais, redução na sucção do colostro e/ou leite, fezes semifluidas e coradas de vermelho, além de desenvolverem o quadro de enterite, com extensa hemorragia e ulceração do intestino delgado (9).

***Clostridium perfringens* tipo C**

Agente primário de enterites necróticas hemorrágicas em leitões com até sete dias de vida, podendo ocorrer de forma precoce, afetando animais com menos de 12 horas de vida. Ao contrário do *C. perfringens* tipo A, o tipo C é encontrado em menor frequência e

quantidade no intestino de animais saudáveis. O agente pode ser transmitido na forma vegetativa de leitões para leitões ou por meio de esporos presentes nas fezes das mães. Em estudos de prevalência Yaeger, Funk e Hoffman (10) diagnosticaram em 100 leitões que apresentavam diarreia com até 10 dias de vida, 2% de *C. perfringens* tipo C como único agente. No Brasil não há trabalhos de prevalência deste agente.

Na forma superaguda os sinais clínicos aparecem entre 12 a 24 horas após o nascimento do leitão, e a morte em até 24 horas. São observadas diarreia hemorrágica com consistência aquosa e severa desidratação. Nos casos agudos, pode-se observar diarreia hemorrágica, com presença de restos necróticos, sinais de dor abdominal, desidratação, apatia e a morte podendo ocorrer por obstrução intestinal ou toxemia. A forma crônica é bem menos frequente, as fezes apresentam coloração amarelada a esbranquiçada, sendo facilmente confundida com as diarreias causadas por outros enteropatógenos (11). À necropsia, as lesões estão comumente restritas ao intestino delgado e podem ser vistos variados graus de hiperemia do mesentério, enterite fibrinonecrotica e conteúdo intestinal sanguinolento. Microscopicamente, as lesões são de necrose profunda da mucosa do intestino delgado, podendo se estender até o ceco e porções do cólon, com hemorragia na lâmina própria, submucosa e camadas musculares (12).

Clostridium perfringens tipo C também é descrito como agente da enterite hemorrágica em ovinos recém-nascidos, determinando um quadro clínico e patológico muito semelhante ao produzido pelo *Clostridium perfringens* tipo B. Ainda é responsável por um quadro superagudo em ovinos adultos denominado de “Struck”, que se caracteriza por morte súbita (2).

***Clostridium perfringens* tipo D**

Agente da enterotoxemia comumente denominada de doença da superalimentação ou do rim pulposo. Enfermidade de distribuição mundial, que afeta primariamente ovinos de qualquer idade com exceção dos recém nascidos, e em menor frequência caprinos e bovinos. No Brasil existem relatos da doença nas três espécies mencionadas (13-15). Alterações na microbiota rumenal em decorrência de mudanças bruscas na alimentação, fornecimento de dietas ricas em carboidratos e pobre em fibras, dentre outros fatores, levam a multiplicação do agente em proporções logarítmicas, produzindo grandes quantidades da toxina épsilon, na forma de protoxina, sendo convertida em uma proteína letal pela ação da tripsina digestiva ou por toxinas secundárias do *C. perfringens*. A toxina ativada atua sobre o epitélio intestinal, causando aumento da permeabilidade vascular, e, ao atingir a circulação sanguínea, atinge órgãos como cérebro, rins, pulmões, fígado e coração, onde se liga a receptores específicos nas células endoteliais, levando a uma degeneração dessas células. Com aumento da permeabilidade vascular, ocorre extravasamento de líquidos e proteínas para o espaço perivascular, com conseqüente edema. Quando ocorre no tecido cerebral é denominado edema perivascular proteináceo eosinofílico ou microangiopatia (16).

Em condições naturais e na maioria dos casos, a morte dos animais ocorre durante as primeiras seis a 18 horas, mas se sobrevivem por mais de 36 a 48 horas, ocorre necrose do tecido cerebral, conhecida como encefalomalácia focal simétrica (17). A forma clínica mais frequente é a superaguda, com morte entre quatro a oito horas, podendo ser observadas alterações neurológicas como opistótono e movimentos de pedalagem; e alterações respiratórias como taquipnéia e edema pulmonar. Caprinos também podem apresentar essas três formas da doença, porém as lesões neurológicas são pouco frequentes, observando-se principalmente lesões entéricas, como diarreias e enterocolites, sendo as lesões neurológicas restritas a achados histopatológicos de edema perivascular proteináceo eosinofílico ou microangiopatia. À necropsia, os achados podem ser pouco evidentes, mas em alguns casos encontram-se hidrotórax, hidropericárdio, hidroperitônio, edema pulmonar e hérnia do

cerebelo (16). Em caprinos, além das alterações anteriormente descritas, observam-se quadros de enterocolites, hemorragias da serosa do cólon, e edema dos linfonodos mesentéricos (13).

***Clostridium perfringens* tipo E**

Produz enterotoxemia em cordeiros, bezerros e coelhos. Sua patogenia está envolvida com a produção da toxina iota, que precisa ser ativada por enzimas proteolíticas para promover a sua atividade biológica, causando citólise. O quadro clínico envolve diarreia hemorrágica com morte do animal em poucas horas. A necropsia observam-se áreas de hemorragia e edema na mucosa intestinal, podendo atingir a mucosa do abomaso (9).

Diagnóstico

O diagnóstico confirmatório está na dependência direta da detecção da(s) toxina(s) produzida pelos agentes, diretamente no conteúdo intestinal. O método convencional para detecção destas toxinas é o teste de soroneutralização em camundongos. Também existem diferentes técnicas de PCR que, apesar de não detectarem diretamente a(s) toxina(s) produzida(s) pelos *C. perfringens* dos tipos A-E, e sim os genes que codificam a produção das mesmas, permitem a tipificação do *C. perfringens* envolvido em um determinado caso ou surto (18). Apesar da presença de toxinas no conteúdo intestinal ser o mais importante indicador das enterotoxemias, é necessário combinar este achado com outros, especialmente o histórico do animal e da propriedade, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia dos órgãos com lesões (2).

Controle

As medidas de controle visam o manejo correto de higiene, desinfecção do ambiente e vacinações sistemáticas de todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as doenças. Nas doenças que afetam animais jovens, a vacinação das fêmeas, no intuito de transferir imunidade passiva à progênie, é a principal estratégia. Nos animais acima de quatro meses de idade recomenda-se a primovacinação, com uma dose reforço quatro a seis semanas após e revacinação anual. Entretanto, a inexistência de vacinas específicas no mercado brasileiro, principalmente para aves e suínos, obriga a utilização cada vez mais precoce de antimicrobianos (9).

DIARRÉIA POR *Clostridium difficile*

Histórico

Apesar de *C. difficile* ter sido isolado pela primeira vez em humanos em 1935, a infecção por este agente em animais domésticos, principalmente suínos e equinos, só foi relatada pela primeira vez na década de 80. Em poucos anos, este micro-organismo ganhou notoriedade como agente de afecções entéricas nestas duas espécies, sendo hoje considerado a principal causa não controlada de diarreia em leitões na Europa e Estados Unidos (19).

Etiopatogenia

A infecção por *C. difficile* inicia-se pela transmissão fecal-oral de esporos eliminados por animais infectados ou portadores saudáveis. Em geral, a microbiota intestinal impede o estabelecimento do agente, sendo que a infecção ocorre na ausência de uma microbiota capaz de inibir a colonização pelo micro-organismo. Dessa forma, comumente *C. difficile* coloniza o

intestino após uma depleção dos micro-organismos intestinais causada pela antibioticoterapia, ou previamente ao estabelecimento completo da microbiota, como ocorre em leitões nas primeiras horas de vida (20). Após a colonização, estirpes de *C. difficile* produzem as toxinas A e B, ambas capazes de causar desorganização do citoesqueleto, comprometendo assim as junções celulares, e causando também arredondamento celular e apoptose. Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, levando a uma intensa migração leucocitária intestinal e agindo também a distância no organismo (21).

A doença

As infecções por *C. difficile* (ICD) em suínos acometem principalmente leitões com até sete dias de idade, ocorrendo contaminação dos neonatos por esporos eliminados pela porca, seguido da colonização logo nas primeiras horas de vida (22). A ICD nesta espécie é caracterizada pelo baixo desenvolvimento corporal, colite e edema de mesocólon, sendo que apenas parte dos animais infectados apresentam diarreia. Dessa forma, é importante ressaltar que a simples ausência de conteúdo diarreico no cólon não descarta a possibilidade de infecção, sendo a doença comumente subclínica em suínos. Outro aspecto relevante da ICD em suínos é a possibilidade de participação em outras comorbidades entéricas, como a infecção por rotavírus, *C. perfringens* ou *E. coli* (23).

No Brasil, levantamentos recentes sugerem uma alta prevalência da doença no Rio Grande do Sul e Minas Gerais (19, 20). Neste último, observou-se que mais da metade das granjas avaliadas possuíam a doença no plantel, sugerindo uma grande disseminação da ICD (24). Além disso, em um estudo de diagnóstico diferencial dos principais enteropatógenos em leitões na maternidade (rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigenica, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*), foram encontradas as toxinas A/B e/ou lesões histológicas características do agente em aproximadamente 50% dos animais. Esses resultados sugerem uma queda na prevalência dos agentes clássicos causadores de diarreia e uma crescente importância de *C. difficile* como patógeno entérico, confirmando a infecção por este agente como uma das principais causas de diarreia neonatal em suínos na atualidade.

Em equinos, a infecção por *C. difficile* acomete potros entre um dia e cinco meses de idade, sendo caracterizada por uma diarreia profusa, desidratação, e presença de gás no intestino grosso (25). A ICD pode ocorrer de forma espontânea ou devido a utilização prévia de antimicrobianos, sendo que os mais comumente relacionados ao desenvolvimento da ICD em equinos incluem principalmente as cefalosporinas, os aminoglicosídeos e os betalactâmicos em geral (25-27).

Trabalhos sobre ICD em potros no Brasil limitam-se a duas descrições de diagnóstico (26, 27), sendo que a prevalência da doença nesta espécie permanece obscura no país. Em ambos os relatos descritos até o momento, houve uma suspeita inicial de salmonelose, havendo agravamento dos sinais clínicos devido à antibioticoterapia incorreta. Estes trabalhos confirmaram a ocorrência da doença em equinos no país e demonstram a necessidade de diagnóstico diferencial para as diarreias em potros, principalmente quando o início dos sinais clínicos ocorreram poucos dias após antibioticoterapia ou em casos onde antimicrobianos comumente utilizados para outras causas de diarreia, como salmonelose por exemplo, não resultam em melhora clínica significativa.

Em equinos adultos, *C. difficile* tem sido relatado como um agente nosocomial causador de diarreia aguda ou cólica durante a internação e após a antibioticoterapia prévia para alguma outra doença (25). Porém, até o presente momento inexistem relatos de infecção por *C. difficile* em equinos adultos no Brasil.

Além da importância direta em medicina veterinária, deve-se destacar ainda que a ICD em animais domésticos tem sido foco de estudos devido a hipótese da ICD em humanos ser uma zoonose. Essa questão surgiu após a demonstração de que estirpes de *C. difficile* isoladas

de produtos cárneos e de animais domésticos possuam grande semelhança genética com estirpes de humanos com ICD (28). Mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de *C. difficile* como agente zoonótico, porém, se confirmada tal suspeita, a prevenção da doença em animais domésticos poderá passar a ser uma prioridade (24).

Diagnóstico

A detecção da presença das toxinas A/B pela visualização do efeito citopático em cultura celular é considerado, pela maioria dos pesquisadores, como o método “padrão-ouro” para o diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile*. Tal técnica tem como vantagem a alta sensibilidade e especificidade. Porém, o resultado é demorado e permite processar apenas poucas amostras por vez. Além disso, a manutenção de linhagens celulares é outro ponto desfavorável pelo alto custo e necessidade de pessoal treinado (29, 30).

Outra opção para detecção das toxinas A/B são os kits comerciais de ELISA, de fácil execução e resultado rápido. Deve-se enfatizar, porém, que todos os kits presentes no mercado até o momento foram padronizados para a detecção das toxinas A/B a partir de fezes de humanos, fazendo com que a sensibilidade e especificidade sejam extremamente variáveis quando aplicados a espécimes clínicos de animais.

Trabalhos avaliando o desempenho de kits para detecção das toxinas A/B em espécimes suínos sugerem que tais produtos apresentam sensibilidade ou especificidade baixas (31). Já para equinos, apenas um kit foi avaliado até o momento e sua performance foi considerada adequada (32). Deve-se destacar, porém, que não existem estudos avaliando os kits comerciais presentes no mercado brasileiro frente a amostras de fezes de suínos e equinos, dificultando o diagnóstico das infecções por *C. difficile* nessas espécies no país.

Além da detecção das toxinas A/B, o isolamento também tem sido utilizado como diagnóstico presuntivo, desde que seguido de confirmação da toxigenicidade do isolado. A confirmação da toxigenicidade comumente é realizada pela detecção dos genes das toxinas A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*) (30). Deve-se destacar, porém, que *C. difficile* pode ser um habitante normal da microbiota intestinal, e apenas o isolamento não confirma a doença (24).

Outra opção relatada para o diagnóstico, ainda pouco utilizada no Brasil, são os kits comerciais de PCR em tempo real (rPCR). Inexistem estudos avaliando a rPCR em amostras de equinos, mas relatos sugerem que a rPCR apresenta grande sensibilidade para humanos e suínos (31). Até o presente momento, a proposta seria a utilização da rPCR como um primeiro teste de triagem, sendo resultados positivos confirmados por CTA, isolamento ou kits comerciais de ELISA de alta especificidade (31, 32). Um grande entrave para utilização da rPCR para diagnóstico de ICD em animais é o custo, que é ainda mais elevado que das outras técnicas de diagnóstico.

Controle e Tratamento

O controle das infecções por *C. difficile* nas espécies domésticas é baseado em medidas gerais de manejo, uma vez que inexistem vacinas disponíveis no mercado brasileiro até o momento. Deve-se enfatizar ainda que o agente é um grande contaminante ambiental, sendo o uso correto de produtos contendo cloro ativo e a higienização das mãos duas estratégias de extrema importância principalmente em hospitais veterinários (25). Vale lembrar que a aplicação de álcool gel nas mãos para eliminação dos esporos desse micro-organismo é ineficiente (33).

Inexistem trabalhos sobre a sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais domésticos no Brasil. Estudos com estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos nos EUA sugerem que tiamulina, virginiamicina e tilosina, incluídos na alimentação dos animais podem ser úteis na profilaxia ou terapia (34). Já em equinos, além da terapêutica

básica de suporte de animais diarreicos, preconiza-se a imediata substituição do antibiótico que culminou com a infecção por metronidazol, primeira escolha, ou vancomicina (25).

TÉTANO

Etiopatogenia

O tétano é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela ação das exotoxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*, as quais provocam alterações funcionais no sistema nervoso central com aumento da excitabilidade. *C. tetani* é cosmopolita sendo comumente encontrado no solo sob a forma de esporos e trato intestinal do homem e animais domésticos (1, 9). A infecção ocorre geralmente pela contaminação por esporos na pele ou mucosa com lesões superficiais ou profundas de qualquer natureza. O corte e cura de umbigo de maneira inadequada é uma potencial porta de entrada aos esporos de *C. tetani* em grandes animais. Fatores como presença de tecidos desvitalizados, corpo estranho, isquemia e infecção contribuem para a diminuição do potencial de oxirredução na lesão o que favorece a germinação dos esporos que se multiplicam e produzem as toxinas tetanolisina e tetanospasmina, sendo a última responsável pelas características clínicas do tétano.

A tetanospasmina é uma potente neurotoxina codificada pelo gene *TeTx* de origem plasmidial não conjugativo. É produzida durante a fase estacionária de crescimento como um polipeptídeo de peso molecular de 150KDa composta de uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC) ligadas por meio de uma ligação dissulfeto. A HC apresenta o domínio de ligação em sua região C-terminal capaz de reconhecer receptores específicos nas terminações pré-sinápticas do sistema nervoso central. A toxina é internalizada e transportada em endossomos até o corpo celular do neurônio motor, localizado na medula espinhal. Em seguida, ocorre a acidificação do endossomo o que resulta em uma alteração conformacional no domínio N-terminal da HC, seguida por sua inserção na membrana do endossomo e passagem da LC para o citosol da célula. Uma vez no citosol, a LC é capaz de clivar proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) responsáveis pela exocitose em neurônios. Com isso, ocorre redução da liberação de neurotransmissores inibitórios como o ácido gama globulínico (GABA) e a glicina resultando em um quadro de paralisia espástica (35).

A tetanolisina é uma hemolisina capaz de provocar lise celular por meio da formação de poros por hidrólise dos fosfolípidos da membrana plasmática (36). O significado clínico desta enzima é desconhecido, entretanto, a mesma é inibida pelo oxigênio e colesterol plasmáticos.

Dentre os animais domésticos, os equinos apresentam maior sensibilidade à neurotoxina de *C. tetani* enquanto que os ovinos e caprinos possuem menor sensibilidade (9, 37). Os gatos apresentam uma suscetibilidade de 7200 vezes menor para desenvolver a doença quando comparados aos equinos (38). O período de incubação é variável, mas comumente é de 1 a 3 semanas (9, 37) e apresenta relação inversa com a gravidade e o prognóstico da doença.

A doença

Clinicamente, a doença manifesta-se com febre baixa ou ausente e hipertonia muscular, ocasionando trismo mandibular, rigidez da nuca, protrusão de terceira pálpebra, disfagia, hiperextensão de membros, opistótono e insuficiência respiratória. A espasticidade da musculatura facial (riso sardônico) comumente observada em humanos já foi descrito em cães e gatos. Inicialmente, os espasmos e contraturas paroxísticas são provocados por estímulos

táceis, sonoros, luminosos ou alta temperatura ambiente e, com a evolução da doença podem ser desencadeados espontaneamente. Em geral, o animal se mantém consciente (37).

Diagnóstico

O diagnóstico do tétano é baseado no histórico, anamnese e sinais clínicos, não dependendo de confirmação laboratorial. À necropsia, não são encontradas lesões significativas (39) e a presença de porta de entrada para o agente nem sempre é observada como em alguns relatos de surtos de tétano idiopático em bovinos jovens (37). É importante o diagnóstico diferencial para intoxicação por metoclopramida e neurolépticos; intoxicação por estricnina com ausência de trismo e hipertonía generalizada durante os intervalos dos espasmos e meningite com presença de febre alta desde o início, ausência de trismo e vômito. Além destes, inclui-se como diagnóstico diferencial a raiva, em que é possível observar a presença de convulsão, alterações de comportamento, ausência de trismo além de histórico de mordedura, arranhadura ou lambadura por animais.

Controle e Tratamento

Os princípios básicos do tratamento do tétano são sedação, neutralização da toxina tetânica circulante por soro antitetânico, debridamento do foco infeccioso, erradicação do agente com administração de penicilina e medidas gerais de suporte. O animal deve ser mantido em ambiente escuro e silencioso, com temperatura estável e agradável a fim de minimizar os sinais apresentados (39).

A vacinação com toxóide é a principal forma de prevenção do tétano e o produto comercial encontra-se disponível para bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos, cães e gatos. A administração de reforço vacinal previamente aos procedimentos cirúrgicos, bem como a administração de soro antitetânico no momento ou após os mesmos é essencial para a profilaxia da doença em equinos (37).

BOTULISMO

Histórico

O botulismo, derivado do latim *botulus*, que pode ser traduzido como embutido, foi descrito pela primeira vez em 1820, na Alemanha, após vários casos de paralisia flácida em humanos associada à ingestão de embutidos e molhos com carnes. Tido inicialmente como um fungo, foi apenas entre 1895 e 1897 que se demonstrou que o botulismo era causado pela toxina de um bacilo anaeróbio, denominado como *Bacillus botulinus*. Durante esse mesmo período, utilizando um filtrado de cultivo celular, livre de bacilos e esporos, sinais de paralisia foram reproduzidos em animais de laboratório, confirmando a existência de uma toxina (40).

Etiopatogenia

Atualmente denominado *Clostridium botulinum*, este bacilo anaeróbio é classificado em sete tipos (A, B, C, D, E, F e G), baseado na especificidade antigênica da neurotoxina (BoNT) produzida por cada estirpe. Codificadas pelo gene *BoNT*, essas toxinas são produzidas como cadeias polipeptídicas de 150 kDa, as quais são clivadas em duas cadeias menores, anteriormente à liberação pelo micro-organismo. Sendo assim, origina-se uma cadeia pesada (HC), de 100 kDa, e uma cadeia leve (LC), de 50 kDa, que permanecem ligadas por meio de uma ligação dissulfeto. A origem do gene *BoNT* varia entre os tipos de *C. botulinum*: tipos A, B, E e F, os quais causam o botulismo humano, são de origem cromossomal; tipos C e D,

responsáveis pela grande maioria dos casos da doença nos animais, possuem origem em bacteriófagos; já para o tipo G a origem é plasmidial (41, 42).

O mecanismo de ação das BoNTs é dotado de três etapas: ligação, translocação e atividade enzimática. Na primeira etapa, as HCs se ligam às membranas de neurônios, principalmente colinérgicos, por meio de um sistema duplo-receptor, constituído por um gangliosídeo e um componente proteico. Em seguida, as BoNTs são translocadas para o citoplasma neuronal via endocitose. Acredita-se que, durante esta etapa, as HCs formem poros na membrana, pelos quais as LCs passam do meio extracelular para o intracelular neuronal. Finalmente, as LCs clivam uma ou mais proteínas SNARE, responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Como resultado, ocorre redução da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que leva à incapacidade para contração muscular ou paralisia flácida dos músculos esqueléticos. Cada sorotipo cliva ligações peptídicas específicas de uma ou mais proteínas SNARE (43).

A doença

As espécies animais possuem diferentes susceptibilidades às BoNTs e ao botulismo. Os equinos parecem ser sensíveis a todos os sorotipos. Os bovinos são susceptíveis aos tipos C e D, raramente acometidos pelos tipos A e B, apresentando quadros agudos ou subagudos. A doença nos ovinos se dá comumente de forma crônica. Os cães são menos sensíveis, sendo o botulismo causado pelos sorotipos A, B e C, mas de forma rara. Já as aves são acometidas pelos tipos C e, mais raramente, A e E, embora elas possam eliminar todos os sorotipos em seus dejetos (44).

O botulismo em bovinos foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1970, no Piauí, e 13 anos depois no Rio Grande do Sul. A partir de então, o botulismo nos ruminantes domésticos começou a ocorrer de forma epizootica. Animais com alta exigência nutricional, como fêmeas gestantes ou em lactação, criados em solos e pastagens pobres em minerais, principalmente fósforo, sem suplementação mineral adequada, desenvolviam o hábito de osteofagia (ingestão de ossos) ou sarcófagia (ingestão de cadáveres), buscando suprir suas deficiências minerais. Porém, concomitantemente, ingeriam as BoNTs pré-formadas durante a decomposição das carcaças, o que levava à grandes epidemias da doença com morte de milhares de animais (9, 37, 45).

Nas duas últimas décadas, o botulismo dos ruminantes vem ocorrendo principalmente na forma de surtos esporádicos. Nesses surtos, as BoNTs ingeridas pelos animais têm origem em alimentos contaminados com matéria orgânica em decomposição, tais como cama de frango, feno, grãos, rações e silagens de má qualidade ou mal armazenados. Além destes, cochos de água com carcaças de pequenos animais ou outros tipos de matéria orgânica em decomposição, bem como poços e lagoas com água estagnada podem servir como fonte de BoNTs para os animais (46-48).

O período de incubação e a severidade do botulismo dependerão da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade da espécie animal. Nos ruminantes, o curso da doença pode ser de horas a poucas semanas e a letalidade é próxima dos 100%. Os sinais clínicos iniciais são dificuldade de locomoção, incoordenação dos membros posteriores, com progressão cranial da paralisia flácida. O animal entra em estado pré-agnônico, sendo que a morte, precedida por coma, ocorre devido à parada cardiorrespiratória. Durante toda a sintomatologia, o psiquismo dos animais permanece inalterado. Lesões à necropsia são raras e limitadas à petéquias no miocárdio como consequência da agonia respiratória, que precede o óbito (9, 37).

Possuindo altas taxas de letalidade e mortalidade, o botulismo é considerado uma das doenças mais importantes que acometem aves silvestres e criações avícolas de subsistência. Destacam-se como fontes das BoNTs para aves: poços e lagoas com água estagnada; larvas de

moscas e outros invertebrados que se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição; alimento ou água fornecidos contendo matéria orgânica em decomposição (49-51). Menos comumente, pode ocorrer o botulismo endógeno, com produção das BoNTs no intestino das aves ou em feridas contaminadas por esporos. Clinicamente, o botulismo nas aves é caracterizado por uma paralisia simétrica ascendente, acometendo patas, asas, pescoço e pálpebras, concomitantemente com perda de penas e psiquismo inalterado. A morte ocorre por parada cardiorrespiratória (52, 53).

Diagnóstico

O diagnóstico do botulismo é baseado nos dados epidemiológicos, sinais clínicos dos animais acometidos e na detecção das BoNTs em espécimes clínicos e/ou fontes de intoxicação. Estes podem compreender os conteúdos rumenal, gástrico e intestinal, fígado, soro, além de amostras dos alimentos e água que os animais possam ter ingerido. O teste padrão para a pesquisa das BoNTs é o bioensaio em camundongos. Esse teste baseia-se na injeção intraperitoneal das amostras diluídas em camundongos, se houver toxina, os camundongos desenvolvem sinais típicos de botulismo, como pêlos arrepiados, fraqueza muscular e dispneia, que se manifesta por estreitamento da cintura, denominado “cintura de vespa”. O tipo da BoNT é determinado pela neutralização da toxina com sua antitoxina específica. Embora o bioensaio em camundongos seja altamente específico e sensível, com limites de detecção de até 0,01 ng/ml de amostra, outros testes “*in vitro*” encontram-se disponíveis ou em desenvolvimento. Destacam-se os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, quimioluminescência, eletroquimioluminescência, radioensaio, ensaio de fluxo lateral, ensaio da endopeptidase e a microfixação do complemento (54, 55).

Controle

A vacinação com os toxóides C e D de *C. botulinum* é a principal forma de controle do botulismo dos animais domésticos, com exceção apenas para as aves. Em associação, outras medidas são extremamente importantes, principalmente aquelas que visam impedir a ingestão das BoNTs pré-formadas pelos animais. Essas medidas compreendem: suplementação mineral adequada dos ruminantes domésticos; retirada das carcaças de mamíferos e aves das pastagens e beiras de cursos de água; produção, armazenamento e fornecimento adequados de alimentos de alta qualidade; não fornecer cama de frango aos ruminantes domésticos sob hipótese alguma; fornecer água de boa qualidade, e impedir que os animais tenham acesso a locais com água estagnada ou de qualidade desconhecida (9, 37).

MIONECROSES

A doença

O carbúnculo sintomático é uma doença aguda de bovinos e ovinos causada exclusivamente por *C. chauvoei*. Em bovinos, a doença ocorre de forma endógena, sendo frequentemente observada em animais jovens. A ingestão de esporos presentes no ambiente constitui-se na principal via de transmissão. Embora a maioria dos esporos seja excretada nas fezes, alguns podem deixar o intestino e serem distribuídos nos tecidos onde permanecem dormentes. A sequência de eventos que leva a distribuição dos endosporos nos tecidos não está clara, mas acredita-se que os mesmos sejam transportados por macrófagos. A gangrena gasosa é uma infecção exógena e necrosante de tecidos moles que acomete diversas espécies

de animais domésticos (56, 57). Essa patologia é causada por uma ou pela associação das seguintes espécies do gênero *Clostridium*: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. A ocorrência dessa doença está relacionada ao estrito contato entre estes agentes e os animais domésticos, o que favorece a contaminação de feridas decorrentes de práticas cirúrgicas e/ou sanitárias realizadas sem cuidados assépticos. Além disso, a injúria tecidual promove diminuição do potencial de oxirredução, alcalinização do pH e decomposição de produtos proteicos. Esses fatores contribuem para penetração, germinação e intensa proliferação de clostrídios, com consequente produção de toxinas responsáveis pelo quadro patológico da doença.

Etiopatogenia

C. septicum foi a primeira espécie de clostrídio identificada, sendo denominada na época de *Vibrion septique* por Pasteur e Jubert, em 1877. A toxina alfa (Quadro 3), principal fator tóxico desse agente, se liga a receptores presentes na membrana celular dos hospedeiros onde são ativadas por clivagem proteolítica (58). Os monômeros ativados se difundem lateralmente na membrana, formando um oligômero (59) que sofre mudanças conformacionais até que um poro ativo que atravessa a membrana citoplasmática seja instalado. O poro promove alteração da permeabilidade celular, seguida por influxo de água e consequente ruptura, determinando lise e citotoxicidade celular (60).

Embora as descrições sobre gangrena gasosa e carbúnculo sintomático tenham sido feitas desde a metade do século XIX, *C. chauvoei* só foi descrito em 1880. Diferentemente das demais bactérias causadoras de mionecroses, foram realizados poucos estudos buscando elucidar a atividade tóxica e os mecanismos de ação das toxinas produzidas por *C. chauvoei*. A toxina CctA (Quadro 3) foi recentemente identificada como o principal fator de virulência desse micro-organismo, tendo capacidade de conferir proteção a animais vacinados com seu toxóide (61). No entanto, considera-se necessário a realização de outros estudos para melhor caracterizar esta e outras proteínas produzidas por *C. chauvoei*.

Clostridium novyi é classificado em quatro tipos, de A a D, de acordo com a produção de toxinas. O tipo A produz apenas a toxina alfa e é o agente da gangrena gasosa em humanos e animais domésticos. O tipo B produz, além da toxina alfa, a toxina beta. O tipo C não produz toxinas e o tipo D, hoje denominado *C. haemolyticum*, causa a hemoglobinúria bacilar em bovinos (62). A toxina alfa de *C. novyi* (Quadro 3) é uma glicosiltransferase que catalisa a glicosilação de pequenas GTPases, determinando a inativação das proteínas do citoesqueleto e desorganização dos filamentos de actina, resultando em efeitos como arredondamento celular, perda das junções intercelulares e aumento da permeabilidade endotelial que é compatível com o edema observado nas afecções causadas por essa bactéria (63).

Clostridium sordellii foi primeiramente isolado em 1922 por Alfredo Sordelli, um microbiologista argentino que denominou a bactéria de *Bacillus oedematis sporogenes* e desde 1928, o nome *C. sordellii* passou então a ser adotado (64). Os animais acometidos por *C. sordellii* tendem a apresentar lesões menos disseminadas e doloridas com dano vascular e hemólise reduzida (65). A virulência dessa bactéria é atribuída a inúmeras exotoxinas, embora apenas a toxina letal e a hemorrágica sejam consideradas essenciais para ocorrência da doença (Quadro 3). Ambas catalisam a glicosilação de pequenas GTPases, diferindo apenas quanto as GTPases alvos (66). Essas toxinas têm uma ação glicosiltransferase, modificando as GTPases que controlam o ciclo celular, apoptose, transcrição gênica e as funções estruturais da actina como morfologia celular, migração e polaridade (64). As modificações induzidas causam condensação da actina, culminando com a desorganização do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (66).

A primeira descrição de *C. perfringens* foi feita a partir de isolados de necropsia de um cadáver com enfisema disseminado (67). Esse clostrídio difere das demais bactérias do gênero

devido a sua relativa aerotolerância, alta e rápida taxa de crescimento e por sua instabilidade genética quanto à expressão dos genes codificadores de toxina. A toxina alfa (Quadro 3), principal fator tóxico envolvido nos casos de gangrena gasosa, interage com os fosfolípidos de membrana onde apresentam potente atividade fosfolipase C, hidrolisando a membrana de células eucariótica. Além disso, essa toxina determina o colapso vascular devido a uma exarcebação nas concentrações de ácido aracdônico e seus metabólitos nas células afetadas, que levam a uma reação inflamatória local e vasoconstrição (68). A toxina alfa ativa a proteína quinase C, determinando a produção do fator de agregação plaquetária com consequente formação de trombos intravasculares fato que contribui para inflamação e anóxia local. A obstrução luminal de capilares por neutrófilos é patognomônico da infecção por *C. perfringens*. As razões da leucoestase são desconhecidas, mas acredita-se que possa estar relacionada à necrose das células endoteliais que impossibilita o rearranjo do citoesqueleto que permite a transmigração das células de defesa (69).

Quadro 3: Clostrídios histotóxicos e caracterização dos principais fatores de virulência

	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. novyi</i>	<i>Clostridium sordellii</i>		<i>C. perfringens</i>
Toxina	Alfa	CctA	Alfa	Letal	Hemorrágica	Alfa
Origem	Plasmídio/ cromossomo	Cromosso	Fago	Cromosso	Cromosso	Cromosso
Peso molecular (Kda)	48	33	250	300	260	42
Ação	Formação poros	Formação poros	Inativação de GTPases	Inativação GTPases	Inativação GTPases	Fosfolipase C

Sinais Clínicos e anatomo-histopatológicos

Quando a gangrena gasosa ou o carbúnculo sintomático não são rapidamente controlados, o animal desenvolve toxemia sistêmica e choque. A morte ocorre como consequência do efeito das toxinas na hemodinâmica do sistema vascular. Clinicamente o animal apresenta temperatura elevada ou normal, anorexia e depressão. Quando um membro é atingido, observa-se dificuldade de locomoção e aumento de volume variável associado à crepitação subcutânea, devido a grande quantidade de gás produzida pela multiplicação bacteriana no foco de infecção, edema e hemorragia. Por vezes, essas alterações são tão intensas que a pele apresenta-se tensionada difusamente vermelha ou preta, com equimoses e sufusões. Não é raro a observação de uma linha delimitando a parte infectada da sadia. Ao corte, pode ser observado extravasamento de líquido, com bolhas de gás e hemorragia do subcutâneo. As fáscias e feixes musculares podem estar separados quando há intensa quantidade de gás. A musculatura apresenta-se intensamente hemorrágica, enfisematosa e com áreas cinza, indicativas de necrose. Histologicamente observam-se fibras musculares difusamente tumefeitas, eosinofílicas, com perda de estriações (degeneração hialina) e/ou difusamente fragmentadas (necrose flocular), na presença de bacilos. A infiltração inflamatória varia de ausente a moderada, constituída principalmente por neutrófilos, sendo observada também hemorragia, edema e gás em graus variáveis no tecido. O carbúnculo também pode correr em sua forma visceral e assintomática, quando órgãos internos, tais como a língua, o diafragma ou o coração, são acometidos. Consequentemente, o animal não apresenta lesões visíveis, e os casos de morte-súbita são frequentes (70).

Diagnóstico

Os clostrídios são micro-organismos saprófitos que promovem a decomposição da carcaça de animais mortos, por isso o material deve ser coletado e imediatamente após a morte ou eutanásia do animal. O material pode ser remetido fresco, resfriado, congelado ou fixado em formalina neutra 10%. O diagnóstico laboratorial das mionecroses é apresentado no quadro 4.

Quadro 4: Métodos para diagnóstico das mionecroses clostridiais.

Método	Vantagem	Desvantagem	Ref.
Isolamento bacteriano	Execução relativamente simples, com meios e reagentes comuns aos laboratórios de bacteriologia de anaeróbios.	Demorado (cerca de 48h) e pode incorrer resultados imprecisos devido a diferente habilidade de crescimento e tolerância ao oxigênio dos clostrídios histotóxicos	(71)
Imunofluorescência direta	Protocolo prático e rápido (cerca de 4 h) que pode ser realizado diretamente do <i>imprint</i> do material coletado.	Requer anticorpos conjugados com fluorocromos e microscópio especial para leitura.	(71)
Imunoistoquímica	A remessa do material em formol evita a autólise dos mesmos impedindo que clostrídios saprófitos se multipliquem. A execução é relativamente simples, sendo a leitura realizada por microscopia de luz.	Relativamente demorado, dependendo de processamento histológico anterior a execução.	(70)
PCR	Execução relativamente simples e rápida.	Requer a etapa de isolamento prévio, somando as desvantagens do método.	(57)

Controle e Tratamento

Os animais acometidos devem ser rapidamente tratados, devido ao curso superagudo da doença, com administração intravenosa de altas doses de penicilina. As chances de recuperação são maiores para animais no início da infecção ou aqueles cuja lesão muscular não esteja disseminada, mas, em geral, os tratamentos não são bem sucedidos. A medida mais importante para controle e prevenção de surtos de mionecroses é a vacinação sistemática do rebanho. A utilização de vacinas resulta numa marcante redução da incidência destas doenças. Porém, é fundamental que sejam adotadas medidas de higiene, tais como a desinfecção de agulhas e instrumental cirúrgico, assepsia dos locais de aplicação de vacinas ou de procedimentos cirúrgicos, manejo adequado de carcaças, dentre outras (9).

REFERÊNCIAS

1. Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 2009;4:1021-64.
2. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:216-34.
3. Yaeger MY. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. In: *Proceedings of the 38th Annual Meeting American Association of Swine Veterinarian*; 2007, Orlando. Orlando: AASV; 2007. p.101-3.
4. Moreno AM, Baccaro MR, Ferreira AJP, Campos DS. Detection of $\beta 2$ toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. *Arq Inst Biol.* 2003;70:135-8.

5. Costa GM, Assis RA, Lobato FCF, Abreu VLV, Santos JL, Uzal FA. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56:401-4.
6. Van Asten AJM, Nikolaou GN, Gröne A. The occurrence of *cpb2*-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J.* 2010;183:135-40.
7. Lee KW, Lillehoj HS, Jeong W, Jeoung HY, An DJ. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci.* 2011;90:1381-90.
8. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011;40:341-7.
9. Lobato FCF, Salvarani FM, Assis RA. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Rev Port Cienc Vet.* 2007;102:23-34.
10. Yaeger M, Funk N, Hoffman L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:281-7.
11. Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:528-36.
12. Miclard J, Jäggi M, Sutter E, Wyder M, Grabscheid B, Posthaus H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet Microbiol.* 2009;137:320-5.
13. Colodel EM, Driemeier D, Schmitz M, Marlise G, Nascimento RAP, Assis RA, et al. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do sul. *Pesqui Vet Bras.* 2003;23:173-8.
14. Riet-Correa F, Tabosa IM, Azevedo EO, Medeiros RM, Simões SVD, Dantas AF, et al. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-árido Foco.* 2003;1:1-4.
15. Lobato FCF, Assis RA, Abreu VLV, Souza Júnior MF, Lima CGRD, Salvarani FM. Enterotoxemia em bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:952-4.
16. Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Assis RA, Lobato FCF, Rachid MA, Carvalho AA, et al. Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol.* 2009;46:1213-20.
17. Oliveira DM, Pimentel LA, Pessoa AF, Dantas AF, Uzal FA, Riet-Correa F. Focal symmetrical encephalomalacia in a goat. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:793-6.
18. Vieira AAS, Guedes RMC, Salvarani FM, Silva ROS, Lobato FCF. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. *Arq Inst Biol.* 2008;75:513-6.
19. Lippke RT, Borowski SM, Marques SMT, Paesi SO, Almeida LL, Moreno AM, et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesqui Vet Bras.* 2011;6:505-10.

20. Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Júnior ECC, Pires OS, Santos RLR, Assis RA, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Cienc Rural*. 2011;41:1130-5.
21. Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev*. 2004;5:321-6.
22. Hopman NE, Keessen EC, Harmanus C, Sanders IM, van Leengoed LA, Kuijper EJ, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol*. 2011;149:186-92.
23. Yaeger MJ, Kinyon JM, Glenn Songer J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:52-9.
24. Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Cienc Rural*. 2013;43:73-80.
25. Baverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q*. 2002;24:203-19.
26. Preis IS, Silva ROS, Pires OS, Lobato FCF, Palhares MS, Maranhão RPA, et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz J Vet Pathol*. 2012;5:7-11.
27. Silva ROS, Moreira FM, Rezende JV, Pires OS, Maranhão RPA, Palhares MS, et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Cienc Rural*. 2012;42:498-500.
28. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1039-45.
29. Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:411-6.
30. Post KW, Jost BH, Songer JG. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest*. 2002;14:258-9.
31. Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, van Asten AJ, Hermanus C, Kuijper EJ, et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1816-21.
32. Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol*. 2011;152:212-5.
33. Macleod-Glover N, Sadowski C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Can Fam Physician*. 2010;56:417-23.
34. Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Vet Microbiol*. 2008;128:204-6.

35. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2012;13:6883-901.
36. Cornile F, Roques BP. Tetanus and botulinum toxins are zinc metallopeptidases: molecular mechanisms and inhibition of their neurotoxicity. *J Soc Biol.* 1999;193:509-16.
37. Lobato FCF, Assis RA, Salvarani FM. Principais clostridioses dos ruminantes domésticos. *Rev Vet Zootec.* 2007;27:36-40.
38. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998.
39. Driemeier D, Schild AL, Fernandes JC, Colodel EM, Corrêa AM, Cruz CE, et al. Outbreaks of tetanus in beef cattle and sheep in Brazil associated with disophenol injection. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2007;54:333-5.
40. Ledermann WD. The History of *Clostridium botulinum*. *Rev Chil Infect.* 2003;20 Suppl:39-41.
41. Brüggemann H. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8:601-5.
42. Swaminathan S. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. *FEBS J.* 2011;278:4467-85.
43. Aoki KR, Smith LA, Atassi MZ. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:167-87.
44. Rodloff AC, Krüger M. Chronic *Clostridium botulinum* infection in farmers. *Anaerobe.* 2012;18:226-8.
45. Baldassi L, Hipolito M, Portugal MASC, Calil BEM, Moulin AAP, Pires DC. Bovine botulism: laboratorial confirmation of clinical diagnosis during the period 1986-1989. *Rev Saude Publica.* 1991;25:371-4.
46. Dutra IS, Döbereiner J, Rosa IV, Souza LAA, Nonato M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21:43-8.
47. Costa GM, Salvador SC, Pereira MN. Botulism in dairy cattle in southern Minas Gerais, Brazil. *Cienc Rural.* 2008;38:2068-71.
48. Lobato FCF, Salvarani FM, Silva ROS, Souza AM, Lima CGRD, Pires PR, et al. Botulism in ruminants being fed with poultry litter. *Cienc Rural.* 2008;38:1176-8.
49. Degernes LA. Waterfowl toxicology: a review. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2008;11:283-300.
50. Fossum O, Jansson DS, Etterlin PE, Vågsholm I. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. *Acta Vet Scand.* 2009;51:1-9.

51. Hoque MA, Skerratt LF, Rahman MA, Rabiul Alam Beg ABM, Debnath NC. Factors limiting traditional household duck production in Bangladesh. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42:1579-87.
52. Trampel DW, Smith SR, Rocke TE. Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Dis.* 2005;49:301-3.
53. Takeda M, Kasai H, Torii Y, Mukamoto M, Kohda T, Tsukamoto K, et al. Protective effect of botulinum C/D mosaic toxoid against avian botulism. *J Vet Med Sci.* 2006;68:325-30.
54. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:298-314.
55. Chaudhry R. Botulism: a diagnostic challenge. *Indian J Med Res.* 2011;134:10-2.
56. Assis RA, Lobato FCF, Nascimento RAP, Maboni F, Pires PS, Silva ROS, et al. Mionecroses clostridiais bovinas. *Arq Inst Biol.* 2010;77:331-4.
57. Ribeiro MG, Silva RO, Pires PS, Martinho AP, Lucas TM, Teixeira AI, et al. Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new multiplex-PCR. *Anaerobe.* 2012;18:504-7.
58. Gordon VM, Nelson KL, Buckley JT, Stevens VL, Tweten RK, Elwood PC, et al. *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:27274-80.
59. Tweten RK. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet Microbiol.* 2001;82:1-9.
60. Melton-Witt JA, Bentsen LM, Tweten RK. Identification of functional domains of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Biochemistry.* 2006;45:14347-54.
61. Frey J, Johansson A, Bürki S, Vilei EM, Redhead K. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. *Vaccine.* 2012;30:5500-5.
62. Songer JG. Clostridial diseases of small ruminants. *Vet Res.* 1998;29:219-32.
63. Titball R, Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG, Peck M, Pelkonen S, et al. Genus *Clostridium*: clostridia in medical, veterinary and food microbiology. Luxembourg: European Concerted Action; 2006.
64. Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1436-46.
65. Cunniffe JG. *Clostridium sordellii* bacteraemia. *J Infect.* 1996;33:127-9.
66. Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:23-47.

67. Welch WH, Nuttall GHF. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov. Spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1982;3:81-91.
68. Titball RW, Naylor CE, Basak AK. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe.* 1999;5:51-64.
69. Hickey MJ, Kwan RY, Awad MM, Kennedy CL, Young LF, Hall P, et al. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *PloS Pathog.* 2008;4:1-9.
70. Pires PS, Silva ROS, Salvarani FM, Ecco R, Lobato FCF. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. *Semin Cienc Agrar.* 2012;33;2337-46.
71. Assis RA, Lobato FCF, Dias LD, Uzal FA, Martins NE, Silva N. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Rev Med Vet.* 2001;82:68-70.

Escola de Veterinária da UFMG

Recebido em: 06/12/12

Aceito em: 17/01/13