

ANO XXXIV - N.º 2



# BOLETIM PECUÁRIO

1966

IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE «CL. PER-  
FRINGENS» QUE ATACAM OS OVINOS  
EM PORTUGAL

*Por*

ARNALDO MENDONÇA MACHADO  
AUGUSTO NAZARETH BARBOSA  
JOSÉ CRISTINA AFONSO

## INTRODUÇÃO

Conhecem-se actualmente seis tipos de «*Cl. perfringens*» (A, B, C, D, E, F), sendo considerados como patogénicos para os ovinos os tipos B, C e D.

Como a própria designação o indica, as enterotoxémias são enfermidades de tipo tóxico, motivadas pela absorção e difusão de grandes quantidades de exotoxina produzida pelo *Cl. perfringens*. De facto, este microrganismo é hóspede habitual do intestino dos ovinos, sem qualquer inconveniente para o hospedeiro. Porém, sob determinadas circunstâncias (em geral ligadas a perturbações digestivas ou modificações do regime alimentar), o parasita inofensivo pode transformar-se, graças à sua enorme multiplicação e à produção de quantidades letais de substâncias tóxicas, em inimigo mortal. Surgem assim as enterotoxémias.

Às enterotoxémias atribuem-se designações diversas consoante os tipos de *Cl. perfringens* que as originam. A doença produzida pelo tipo B costuma ser designada por *Lamb-dysentery* ou «diarreia dos cordeiros» ou «disenteria dos cordeiros» e ataca em especial os animais muito jovens; o tipo C é responsável pelo *Struck* ou *Strike* dos ingleses e vitima ovinos adultos, havendo também a indicação de casos em vitelos e suínos (USA); o tipo D ocasiona a *pulpy kidney disease* ou *braxy like disease* ou «enfermidade do rim pulposo» ou enterotoxémia propriamente dita» e é patogénico para os ovinos de todas as idades e com menos frequência para o gado bovino, principalmente vitelos.

A identificação laboratorial de cada um destes tipos baseia-se em provas bioquímicas e, em especial, na exotoxina elaborada pelo germe. Conhece-se toda uma série de factores tóxicos cuja maior ou menor incidência varia segundo os diversos tipos de toxina produzida pelo *Cl. perfringens*, de acordo com o quadro I.

QUADRO I

Factores	Tipos de « <i>Cl. perfringens</i> »					
	A	B	C	D	E	F
$\alpha$	+++	+	+	++	++	+
$\beta$	—	+++	+++	—	—	+++
$\gamma$	—	+	±	—	—	+
$\delta$	—	+	+++	—	—	—
$\epsilon$	—	+	—	+++	—	—
$\eta$	±	—	—	—	—	—
$\theta$	++	+	+	+	+	—
$\iota$	—	—	—	—	+	—
$\kappa$	++	—	++	±	+	—
$\lambda$	—	+	—	±	+	—
$\mu$	+	—	+	+	—	—

O factor  $\alpha$  possui acção letal, necrótica, hemolítica e lecitínásica.

O factor  $\beta$  é poderosamente letal e necrosante.

O factor  $\gamma$  caracteriza-se por fraca acção letal, não hemolítico e não necrosante.

O factor  $\delta$  é letal, mas de fraca acção dermo-necrótica.

O factor  $\epsilon$  evidencia-se como factor letal e necrosante, mas não hemolítico.

O factor  $\eta$  é letal.

A capacidade hemolítica constitui a principal característica do factor  $\theta$ .

$\nu$  é um factor letal e necrosante.

Os factores  $k$  e  $\lambda$  não são letais, distinguindo-se por atacarem não só as proteínas, como o colagénico o primeiro, e a gelatina o segundo.

O factor  $\mu$  é uma hialurodinase.

Do jogo de interacções e predominâncias de cada um destes factores resultam as características apresentadas pelos seis tipos tóxicos de *Cl. perfringens* conhecidos.

Na prática, os métodos de trabalho com a toxina têm-se revelado superiores aos de actividade bioquímica e foram esses processos que se seguiram nos ensaios realizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção da toxina fez-se através da recolha de conteúdo intestinal de ovinos mortos sob suspeita de enterotoxémia.

Este conteúdo (do intestino delgado) era submetido à filtração por discos de Seitz EK, obtendo-se um líquido isento de agentes bacterianos, onde existia apenas a exotoxina produzida pelo germe. Algumas vezes, dada a grande viscosidade do conteúdo, não foi possível fazer a filtração, sendo esta substituída por centrifugação durante 30 minutos, a 4000 rotações, com utilização do líquido sobrenadante.

Para a apreciação do *poder letal da toxina* usaram-se ratinhos brancos com o peso de 17/20 gramas inoculados endovenosamente, utilizando-se para esse efeito as veias da cauda. A dose de inoculum foi de 0,5 cc. Esta dose correspondia a uma mistura, em partes iguais, de conteúdo intestinal e de soluto fisiológico. Inoculavam-se 6 ratinhos para cada amostra.

A inoculação endovenosa de ratinhos com conteúdo intestinal em natureza provocava, por vezes, a morte dos animais, sem que essa morte tivesse relação com a existência de toxina.

A segunda parte do trabalho consistia na prova de *neutralização sorológica*, para a execução da qual se utilizaram soros mono-específicos do Instituto Pasteur de Paris, anti- $\alpha$  (A), anti- $\beta$  (B), anti- $\delta$  (C) e anti- $\epsilon$  (D). Tomando em consideração o quadro atrás, constata-se que, no tipo A, predomina o factor tóxico  $\alpha$ , no tipo B o factor  $\beta$ , no tipo C os factores  $\beta$  e  $\delta$ , no tipo D os factores  $\alpha$  e  $\epsilon$ , no tipo E o factor  $\alpha$  e no tipo F o factor  $\beta$ .

Fazendo a mistura da toxina que se pretende classificar com cada um dos soros, obtêm-se determinados resultados que permitem concluir acerca do tipo de toxina em presença do qual nos encontramos, como indica o quadro II.

QUADRO II

Toxina perfringens misturada com:					Conclusão
Soro anti-A	Soro anti-B	Soro anti-C	Soro anti-D	Soro anti-E	
∞	∞	∞	∞	∞	Toxina tipo A
†	∞	∞	†	†	» » B
†	∞	∞	†	†	» » C
†	∞	†	∞	†	» » D
†	∞	†	†	∞	» » E
†	∞	∞	†	†	» » F

† — ratinhos mortos (toxina não neutralizada)  
∞ — » vivos (neutralização da toxina)

A técnica consistiu em adicionar 0,3 cc. de toxina (correspondente a 2 a 4 D. M. M.) a 0,2 cc. de cada um dos soros diluídos a 1/10. Esta mistura permanecia durante 1 hora na estufa a 37° C, após o que era inoculada (0,5 cc.) em ratinhos de 17/20 grs., por via endovenosa.

Pela observação do quadro II, verifica-se que as toxinas dos tipos B, C e F são idênticas sorològicamente, pelo que nestes casos há necessidade de recorrer a outras provas, entre as quais a da collagenase que só por si permite separar o tipo C (que produz collagenase) dos tipos B e F (que não a produzem).

## RESULTADOS

Os ensaios realizados incidiram sobre o conteúdo intestinal de 79 cadáveres de ovinos suspeitos de enterotoxémia, tendo sido constatada a existência de toxina, com poder letal para o ratinho, em 18 casos.

À data do início deste trabalho (fins de 1958) não existia na literatura qualquer menção sobre os tipos de *Cl. perfringens* causadores de enterotoxémias no nosso país, mas posteriormente (Maio de 1959) tomou-se conhecimento da Tese de Doutoramento do Sr. Doutor J. A. C. Abreu Lopes intitulada «Enterotoxémia infecciosa ovina», na qual se indica o isolamento dos tipos A e D.

Nos ensaios de que se está dando conta foi isolado apenas o tipo D, correspondente aos 18 casos de toxina letal acima mencionados. Quanto ao tipo A, não foi identificado, mas este tipo, de resto, possui escasso valor em relação à patologia dos ovinos.

### RESUMO

Os AA. mencionam a identificação do tipo D de *Cl. perfringens* em ovinos nacionais, no decurso de ensaios realizados durante os anos de 1959 e 1960, usando a técnica de neutralização sorológica.

Descrevem-se os métodos usados e os resultados obtidos, com 18 casos positivos em 79 amostras de conteúdo intestinal examinadas.

### RÉSUMÉ

Les AA. ont identifiés «*Cl. perfringens*», type D, aux ovins portugais (1959/60).

Dans ce travail ils se rapportent à la technique adoptée et aux résultats obtenus.

### SUMMARY

The AA. describes the identification of «*Cl. perfringens*», D type, in the portuguese sheep (1959/60).

They refers diagnostic technics carried out and the results obtained.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — ABREU LOPES, J. A. C. — *Enterotoxémia infecciosa ovina* — Lisboa, 1958.
- 2 — BALDWIN, BARL — *Enterotoxémia clostridial* — Veterinary Medicine, 3, 123, Setembro de 1959.
- 3 — BALDWIN, E. M. — *Enterotoxaemia of sheep and its control* — Vet. Med., 45, 475, 1950.
- 4 — BEERENS, H. — *Amélioration des techniques d'étude et d'identification des bactéries anaérobies* — Ann. Inst. Pasteur de Lille, 6, 36 a 52, 1953.
- 5 — BENNETTS, H. W. — *«Infections entero-toxaemia» pulpy kidney and other related diseases of sheep* — The Vet. Journal, 88, 248, Junho, 1932.
- 6 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* — 6.<sup>a</sup> Ed., The Williams & Williams Company, 1948.
- 7 — BOSWORTH, F. J. e GLOVER, R. E. — *The effect on «Cl. Welchechi toxin of a substance présent in the normal intestine»* — Rept. from Inst. Aun. Pathol, Cambridge, 4, 79, 1935.
- 8 — BRISON, J. — *Culture des bactéries anaérobies à l'air libre en milieu VFS papainique* — Ann. de l'Inst. Pasteur, vol. 79, n.<sup>o</sup> 3, 331, Setembro, 1950.
- 9 — BULLEN, J. J. — *Enterotoxaemia of sheep: «Cl. Welchii, type D in the alimentary tract of normal animals»* — J. of Path and Bact., 64, 201 — 1952.
- 10 — BULLEN, J. J. e BATTY, J. — *Experimental Enterotoxaemia of sheep: the effect on the permeability of the intestine and the stimulation of antitoxin production in immune animals* — Journ. of Path. and Bact. vol. LXXIII, n.<sup>o</sup> 2, 511-518, 1957.
- 11 — BULLEN, J. J. e SCARISBRICK, R. — *Enterotoxaemia of sheep: experimental reproduction of deases* — Journ. of Pathol. and Bacteriol, vol. LXXIII, n.<sup>o</sup> 2, 495-509, 1957.
- 12 — BULLEN, J. J. e SCARISBRICK, R. e MADOCH, A. — *Enterotoxaemia of sheep: the fate of washed suspensions of «Cl. Welchii, type D introduced into the rumen of normal sheep»* — Journ. Path. Bact. 65, 209-219, 1953.
- 13 — DALLING, J. — *Considérations pratiques sur les mesures preventives des troubles de la nutrition — L'exploitation et l'alimentation du bétail* — O. E. C. E., 49, 1956.
- 14 — DEDIÉ, K., SCHEIBNER, G. e PRENS, H. — *La enterotoxémia de tipo C em Alemanha* — Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin, tomo XI, c. 6, 921, Jul, 1950.
- 15 — DINTER, Z. — *The differentiation of anaerobic infections* — Berlin Murachtierarzte Wschr, n.<sup>o</sup> 7/8, 50, 1943.
- 16 — DUFF, D. C. B. — *Effect of medium constituents on toxin production by «Clostridium welchii»* — Canadá. Journ. publ. Heath., 38, 90, 1947.
- 17 — EVANS, D. J. — *Enterotoxaemia of sheep* — J. Dep. Agric. Victoria, 17, 41, 1943.
- 18 — FABRICANT, J. — *Overeating disease (enterotoxaemia) of sheep* — Thesis. The Cornell Vet. 69, 1946.
- 19 — FRANK, F. W. — *Clostridium perfringens, typi B, from Enterotoxaemia in young ruminants* — Am. Journ. of Vet. Research n.<sup>o</sup> 64, 492, Julho 1956.
- 20 — GEYER, A. e BABIN, R. — *Milieu simple pour l'isolement et la culture des anaérobies* — Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 92, 36 a 38, 1954.
- 21 — GLENNY, A. T.; BARR, M; LLEWELLY TONES, M; DALLING, T. e ROSS, H. — *Multiple toxins produced by some organisms of the «Cl. welchii» group* — Journ. of Path. and Bact., n.<sup>o</sup> 1, 53, 37, 1933.
- 22 — GUILLAUMIE, M. — *Comparaison des toxines élaborés par deux souches de bacillus perfringens* — Ann. de l'Inst. Pasteur, vol. 70, 207, 1944.
- 23 — GUILLAUMIE, M. e KRÉGNER, A. — *Caractérisation des divers types de Cl. perfringens — remarques sur l'activité des sérums antigangreneux* — Revue de Immunologie et thérapie antimicrobienne, 15, n.<sup>o</sup> 1 e 2, 47, 1951.



- 24—GUILLAUMIE, M.; KRÉCNER, A. e FABRE, M.—*Antigènes des toxines perfringens A, B, C e D*—Ann. de l'Inst. Pasteur, vol. 72, 11, 12, 908, Novembro/Dezembro, 1946.
- 25—GUILLAUMIE, M.; KRÉCNER, A. e FABRE, M.—*Propriétés comparées des toxines élaborées par les différents types de «Cl. perfringens—1. État actuel de la question»*—Ann. de l'Inst. Past., vol. 72, 8,553, Julho/Agosto, 1946.
- 26—GUILLAUMIE, M.; KRÉCNER, A. e FABRE, M.—*Action de la chaleur sur la toxine et la prototoxine «Cl. perfringens D»*—Ann. de l'Inst. Pasteur, vol. 78, 6, 740, Julho, 1950.
- 27—KATITCH, R. W.—*Résultats de recherches relatives à la valeur de la méthode d'hémagglutination en vue de la détermination des types de «W. perfringens»*—Revue d'Immunologie, vol. 18, n.º 3, 199, 1954.
- 28—LEBERT e TARDIEUX—*Technique d'isolement et de détermination des Bactéries anaérobies*—(Collection des Travaux de Pathologie Comparés), 2.<sup>a</sup> Edition, 1952.
- 29—NEWSON, I. E.—*Sheep diseases*—Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1952.
- 30—NEWSON, I. E. e THORP, F.—*The toxicity of intestinal filtrates from lambs dead of overeating*—Jorn. Am. Vet. Med. Assoc. 93, 165, 1938.
- 31—OAKLEY, C. L. e WARRACK, G. H.—*Routine typing of Cl. Welcchii*—Jorn. Hyg, 51, 102 a 107, 1953.
- 32—PRÉVCT, A. R.—*Études de systématique bactérienne. IV — Critique de la conception actuelle du genre Clostridium*—Ann. de l'Inst. Pasteur, 61, 72, 1932.
- 33—PRÉVCT, A. R.—*Position dans la systématique des nouveaux types toxigènes E et F du groupe W. perfringens — W. ogni.*—Ann. de l'Inst. Pasteur, 77, 491, 1949.
- 34—TOPLEY, W. W. C.; WILSON, G. S. e MILES, A. A.—*Bacteriologia e imunidade*—Tomo I, Salvat Editores, S. A.—Madrid, 1949.
- 35—WHITLOCK, J. A. & BAKER, D. W.—*The diagnosis of diseases of lambs*—Rep. N. York St. Veterin. Colleg. 14a, 92 a 99, 1945/1946.