



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**SISTEMA INTEGRADO DE DIAGNÓSTICO EM DOENÇAS
DE BOVINOS: DO SINAL CLÍNICO AO DIAGNÓSTICO
CONCLUSIVO**

Carolina de Castro Guizelini

Campo Grande – MS
2020

**SISTEMA INTEGRADO DE DIAGNÓSTICO EM DOENÇAS
DE BOVINOS: DO SINAL CLÍNICO AO DIAGNÓSTICO
CONCLUSIVO**

*Integrated bovine diseases diagnostic system: from clinical signs to the
conclusive diagnostic*

Carolina de Castro Guizelini

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida. A meus pais, Yanara e Luiz Antônio, e irmãs, Natália e Cecília, pelo suporte e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Ao meu companheiro de vida Danilo, que não mede esforços para me ajudar e me levantar nos momentos que mais preciso. Ao meu orientador e segundo pai, professor Ricardo Lemos, por acreditar em mim e me proporcionar oportunidades de crescimento inimagináveis. À médica veterinária e amiga Rayane, por estar sempre presente ao meu lado, nos dias bons e ruins. À colega de trabalho e amiga Juliana, que “segura a barra” e não mede esforços para me ajudar sempre que preciso. À Raiza, à Mariana e à Fernanda, que me acompanham desde o início da graduação e estão comigo sempre, mesmo de longe. A todos vocês, a minha gratidão; não seria metade da pessoa e profissional que sou hoje sem os exemplos, ensinamentos e puxões de orelha que me proporcionam diariamente. Vocês são meus espelhos e me ajudam a ser melhor, mesmo sem terem conhecimento disso. Esta etapa que estou finalizando é, em boa parte, graças a vocês. Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro durante todo o meu mestrado.

"Whatever the mind can conceive and believe, it can achieve."

Napoleon Hill

Sumário

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	viii
1. CAPÍTULO I.....	10
1.1. Introdução	10
1.2. Objetivos	11
1.3. Materiais e métodos	12
1.4. Resultados	13
1.5. Discussão	16
1.6. Conclusão	19
1.7. Referências bibliográficas	19
2. CAPÍTULO II.....	22
2.1. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves	22
2.2. Blackleg in inadequately immunized calves and their recovery following antibiotic therapy	36
2.3. Approaches for a field diagnosis of abamectin poisoning in calves	49
Anexos	55
A.CONDUTA DIAGNÓSTICA EM DOENÇAS DE BOVINOS DE CORTE – Guia Prático	55
Introdução.....	55
Conceitos básicos para a conduta diagnóstica em doenças de bovinos de corte	56
CAPÍTULO I.....	68
Como utilizar este guia.....	68
CAPÍTULO II.....	70
Caso clínico 1. Raiva	70
Caso clínico 2. Botulismo	75
Caso clínico 3. Carbúnculo sintomático	80
Caso clínico 4. Intoxicação por abamectina	84
Referências Bibliográficas	87

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Frequência de enfermidades diagnosticadas pelo LAP/FAMEZ de janeiro de 2019 a janeiro de 2020.....	14
--	----

Capítulo II

A. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves

Table 1. Results for bacterial culture and PCR from calves with Salmonellosis.....	26
--	----

B. Blackleg in inadequately immunized calves and their recovery following antibiotic therapy

Table 1. Calves at risk of contracting blackleg as distributed in their holdings, their vaccination schedules, and the morbidity and mortality per holding.....	31
---	----

Anexos

Tabela 1. Situação hipotética de mortalidade de bovinos para o entendimento de como utilizar este guia.....	68
Tabela 2. Lista de diagnósticos diferenciais de doenças de bovinos jovens, seus respectivos achados de necropsia, sinais clínicos, tecidos a serem coletados e forma de acondicionamento destes.....	83

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

A. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves

Figure 1. Salmonellosis in calf. The lungs are non-collapsed and are diffusely red. The liver is enlarged, with multiple orange foci at the capsular surface.....	27
Figure 2. Salmonellosis in calf. The cecal content is dark brown and has big clots of fibrin...	28
Figure 3. Salmonellosis in calf. In the liver, there are multiple random foci of necrosis with fibrin, necrotic debris, neutrophils and a few macrophages. Fibrin thrombi are seen in vessels walls. The sinusoids and the cytoplasm of hepatocytes are filled with bile pigment. H&E, 10x.....	28
Figure 4. Salmonellosis in calf. In the lungs, alveolar septa are thickened due to infiltrate of macrophages, lymphocytes and plasma cells. Fibrin clots are seen in some alveolar lumen. H&E, 40x.....	29
Figure 5. Salmonellosis in calf. The parenchyma is disrupted by multiple extensive foci of necrosis with fibrin deposition. H&E, 10x.....	30

B. Blackleg in inadequately immunized calves and their recovery following

antibiotic therapy

Figure 1.	Blackleg lesions in cattle. Skeletal muscle. There are multiple and coalescent foci of hemorrhage, necrosis and emphysema.....	41
Figure 2.	Blackleg lesions in cattle. The right hemitorax is filled for a dark red fluid intermixed with fibrin; clots of fibrin cover multiple areas of pleura; note the pericardial sac enlargement composed of gelatinous and yellow material (edema) with fibrin (arrow).....	41
Figure 3.	Blackleg lesions in cattle. Big clots of fibrin recover multiple areas of the epicardium; small foci of hemorrhage are seen.....	42
Figure 4.	Blackleg lesions in cattle. Skeletal muscle. The myofibers are desuniform, hypereosinophilic, shrunken and with loss of the cross striations; the perimysium and endomysium are moderately expanded by a non-stained material (edema) intermixed with erythrocytes and fibrin aggregates (asterisk). H&E, 10x.....	43

Anexos

Figura 1.	Botulismo decorrente de osteofagia. Ossos espalhados em piquetes onde bovinos pastejam.....	57
Figura 2.	Epidemiologia da raiva bovina. Cavernas são uns dos locais de predileção dos morcegos hematófagos.....	59
Figura 3.	Polioencefalomalacia. Opistótono verdadeiro.....	63
Figura 4.	Botulismo em bovinos confinados. Diminuição do tônus muscular da língua.....	64
Figura 5.	Epidemiologia da raiva bovina. Galpão abandonado, escuro e repleto de árvores ao redor.....	70
Figura 6.	Epidemiologia da raiva bovina. Região caudal da quartela apresentando área de espoliação por morcegos.....	71
Figura 7.	Epidemiologia da raiva bovina. Bovino em decúbito esternal e alerta aos estímulos do ambiente.....	72
Figura 8.	Achados macroscópicos da raiva bovina. Bexiga acentuadamente repleta por urina de coloração normal.....	74
Figura 9.	Achados macroscópicos da raiva bovina. Os vasos sanguíneos das meninges estão acentuadamente ingurgitados (hiperemia).....	74
Figura 10.	O gânglio trigeminal é um dos principais tecidos a ser coletado nos casos suspeitos de raiva.....	75

Figura 11. Botulismo em bovinos confinados. Decúbito esternal e posicionamento da cabeça próxima ao flanco.....	76
Figura 12. Botulismo alimentar em animais confinados. Grumos compactos de milho administrados para os bovinos.....	77
Figura 13. Fluxo geral do processo para o diagnóstico de botulismo.....	78
Figura 14. Intoxicação por <i>S. occidentalis</i> em um bovino. Músculo esquelético apresentando áreas pálidas extensas intercaladas com áreas normais.....	79
Figura 15. Carbúnculo sintomático. Musculatura esquelética com um foco extenso hemorrágico e preenchido por cavitações (áreas de enfisema).....	81
Figura 16. Carbúnculo sintomático. Ao ser imerso em formol a 10%, o músculo esquelético flutua.....	82
Figura 17. Babesiose cerebral em bezerros. Nota-se a coloração vermelha-escura distribuída difusamente pelo telencéfalo	86

RESUMO

GUIZELINI, C.C. Sistema integrado de diagnóstico em doenças de bovinos: do sinal clínico ao diagnóstico conclusivo. 2020. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020. Devido à alta relevância da indústria pecuária brasileira, os surtos de doenças são responsáveis por perdas econômicas substanciais. Para evitá-los, é essencial a manutenção de um sistema de diagnóstico integrado, a partir do qual os Laboratórios de Diagnóstico Veterinário (LDVs) constituem uma parte crítica. Em muitos LDVs brasileiros, a maioria das amostras para análise é enviada por veterinários de campo. Embora o exame dessas amostras gere conhecimento, muitas vezes esse conhecimento não é estendido aos veterinários de campo. É necessário, então, fornecer métodos de conscientização para os veterinários que trabalham em propriedades rurais sobre as principais doenças que ocorrem em sua região, buscando minimizar a perda econômica causada por essas doenças. Assim, caracterizamos os aspectos epidemiológicos e clinicopatológicos das principais doenças bovinas em Mato Grosso do Sul. Isso foi realizado por meio de estudos retrospectivos e prospectivos dos casos acompanhados pela equipe do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Organizamos as informações em um formato para ajudar os profissionais a elaborar diagnóstico presuntivo de maneira rápida e eficiente. Cento e cinquenta espécimes de tecido de bovinos foram enviados para análise de janeiro de 2019 a janeiro de 2020. Um diagnóstico conclusivo foi estabelecido em 64,6% dos casos. Dos diagnósticos inconclusivos, 73,6% eram enviados por veterinários de campo ou por órgãos estaduais de vigilância sanitária. As doenças inflamatórias e parasitárias foram a principal causa de morte no período estudado. A raiva foi a doença mais frequentemente diagnosticada. Alguns dos principais fatores que impediram um diagnóstico conclusivo em amostras enviadas ao laboratório foram a não inclusão de amostras de sistema nervoso central nos casos com sinais clínicos neurológicos.

Estas falhas durante a coleta de dados e de materiais são pontos cruciais para o desfecho do processo de diagnóstico que, muitas vezes, inviabilizam a realização de um diagnóstico conclusivo, como foi observado neste estudo.

Palavras-chave: epidemiologia, doenças de bovinos, patologia

ABSTRACT

GUIZELINI, C.C. Integrated bovine diseases diagnostic system: from clinical signs to conclusive diagnostic. 2020. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Due to the high relevance of the Brazilian cattle industry, disease outbreaks are responsible for substantial economic losses. To avoid those losses is essential to perform an integrated diagnostic system, to which the Veterinary Diagnostic Laboratories (VDLs) will contribute as a critical part. In many Brazilians VDLs, most of the samples for analysis are sent by field veterinary practitioners. Although there is much knowledge produced, often, it is not extended to field practicing veterinarians. It is then necessary to provide awareness methods for veterinarians who work in farms about the major diseases that occur in their region, seeking to minimize the economic loss by diseases. Thus, we characterized the epidemiologic and clinicopathologic aspects of the most important cattle diseases in Mato Grosso do Sul. This was accomplished through retrospective, and prospective studies of the cases accompanied by the team of the Pathologic Anatomy Laboratory from the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. We organized the information in a format that can help practitioners fast and efficiently elaborate a presumptive diagnostic. A hundred and fifty tissue specimens from cattle were sent for analysis from January 2019 to January 2020. A conclusive diagnostic was established in 64,6% of those. Of the inconclusive diagnosis, 73.6% were sent by field veterinarians and by state surveillance agencies. Inflammatory and parasitic diseases were the main cause of death in the studied period. Rabies was the most frequently diagnosed disease. Some of the principal factors that contributed to an inconclusive diagnosis in mailed-in samples were the non-inclusion of specimens of central nervous system in cases with neurological clinical signs. These flaws during the data and material collect are important points to the diagnostic process, which generally make a conclusive diagnostic unfeasible, as observed in this study.

Keywords: diseases of cattle, epidemiology, pathology

1. CAPÍTULO I

1.1. Introdução

Devido à grande importância da bovinocultura brasileira, surtos de doenças levam a grandes prejuízos econômicos para o país, com perda dos animais por morte, proibição da movimentação de bovinos, custos de milhões de dólares em indenizações e em operações de interdição nos casos em que há restrição à exportação de produtos de origem bovina, como ocorreu nos surtos de febre aftosa, em que houve a eutanásia de grandes números de bovinos (OMS, 2000; FIGUEIREDO et al., 2009).

Além dos prejuízos que as doenças de notificação compulsória causam, enfermidades de qualquer outra etiologia também acarretam perdas para o produtor, e isto também reflete no panorama da pecuária de seu respectivo estado. Em Mato Grosso do Sul, foi demonstrado que intoxicações por plantas como *Vernonia rubricaulis* totalizaram prejuízos de U\$756.915,74 (SOARES et al., 2019), enquanto em um estudo retrospectivo de mortes por carbúnculo sintomático (HECKLER et al., 2018), as perdas econômicas variaram de 0,75 a 27,5% do valor total do rebanho, contabilizando um total de R\$190.744,00. Esses dados demonstram que para evitar grandes prejuízos como os demonstrados anteriormente, é essencial a realização de um sistema integrado de diagnóstico, o qual é composto pela associação dos sinais clínicos, dados epidemiológicos, anatomopatológicos e exames laboratoriais, como cultura microbiológica, testes histoquímicos e moleculares, exames parasitários, entre outros (LEMOS, 1996).

Os laboratórios de diagnóstico veterinário (LDVs) são parte fundamental deste sistema integrado por fornecerem desde o estabelecimento do diagnóstico, prevenção, controle e tratamento de doenças, até o desenvolvimento e melhoria de técnicas diagnósticas (SCHULZ et al., 2012). Em muitos LDVs do Brasil, grande parte das amostras de tecidos - em sua maioria, oriundas de necropsias - de bovinos são remetidas por médicos veterinários de campo que buscam a causa da morte dos mesmos. Entretanto, estudos retrospectivos realizados por esses LDVs (LUCENA et al., 2010; SPRENGER et al., 2015; MELLO et al., 2017; RONDELLI et al., 2017; PUPIN et al., 2019) apontam que 72,9% a 89,94% dos diagnósticos inconclusivos são provenientes

das amostras de tecidos que médicos veterinários de campo remetem, e as principais razões apontadas para essa indefinição incluem o envio de tecidos em quantidade insuficiente ou em avançado estágio de autólise, a ausência do encaminhamento de órgãos que possivelmente estejam associados aos sinais clínicos relatados, e a falta de informações clínico-patológicas e epidemiológicas. Diante disso, visando a redução do número de diagnósticos inconclusivos devido às falhas no encaminhamento de amostras de tecidos aos LDVs, é necessário que seja realizada a coleta sistemática de dados epidemiológicos e clínicos, descrição completa dos achados macroscópicos e que ocorra o envio de amostras de tecidos coletadas e acondicionadas de forma adequada para a realização de exames laboratoriais (LEMOS, 2005; RISSI et al., 2010).

Embora exista grande quantidade de conhecimento produzido nos LDVs, muitas vezes este não é transferido aos demais profissionais externos, prejudicando o processo da busca por menores índices de diagnósticos inconclusivos (LEMOS, 2005). Com base nos dados anteriores, faz-se necessária a elaboração de métodos de conscientização de médicos veterinários que atuam no campo acerca das principais doenças presentes no estado e a respeito das técnicas de coleta e envio de amostras de tecidos necessárias para a realização de um diagnóstico conclusivo pois, através destas informações, será possível o estabelecimento do diagnóstico de forma rápida e precisa, para assim serem realizadas as tomadas de decisões acerca do tratamento, controle de surtos e prevenção de novos casos, visando minimizar ao máximo o prejuízo econômico relacionado a perdas por doenças.

1.2. Objetivos

Objetivos Gerais

Caracterizar os quadros epidemiológicos, clínicos e patológicos das principais doenças de bovinos em Mato Grosso do Sul através de estudo prospectivo dos casos atendidos pela equipe do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Objetivos Específicos

Realizar estudo prospectivo das enfermidades de bovinos de Mato Grosso do Sul diagnosticadas pelo LAP-FAMEZ-UFMS no período compreendido entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020, identificando as principais enfermidades de bovinos neste período e seus respectivos sinais clínicos, características epidemiológicas e achados de necropsia que permitam a realização de uma lista de possíveis diagnósticos diferenciais para determinadas situações;

Realizar a confecção de material prático ilustrado que resumirá as doenças de bovinos mais importantes de Mato Grosso do Sul e suas principais características clinico-patológicas e epidemiológicas que possam auxiliar veterinários a campo a elaborarem diagnósticos presuntivos de forma rápida e eficiente.

1.3. Materiais e métodos

B. Estudo prospectivo

O estudo prospectivo foi realizado avaliando-se os protocolos de bovinos registrados entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020, provenientes de necropsias e biopsias realizadas pela equipe do LAP-FAMEZ e por médicos veterinários que atuam no campo, no estado de Mato Grosso do Sul. A classificação das enfermidades foi feita de acordo com as categorias definidas no estudo retrospectivo.

Quanto ao processo de diagnóstico das enfermidades, aquelas que apresentaram padrões clínico-patológicos e/ou epidemiológicos distintos do observado no estudo retrospectivo utilizando série histórica (24 anos) sobre as doenças de bovinos em Mato Grosso do Sul (PUPIN et al., 2019) ou doenças que ainda não foram diagnosticadas pela equipe do LAP foram analisadas separadamente, com a finalidade de elaboração de estudos específicos para publicações em periódicos especializados.

Com base nas informações obtidas retrospectivamente e prospectivamente, foram identificadas as principais doenças de bovinos diagnosticadas pela equipe do LAP/UFMS. Destas, para a confecção do material de apoio, foram destacadas as características epidemiológicas, sinais clínicos e achados de necropsia que permitam que veterinários de campo elaborem uma lista de enfermidades suspeitas.

C. *Confecção de material de apoio*

Com base nas informações contidas nos laudos de necropsia durante o estudo prospectivo e estudo retrospectivo anteriormente realizado (PUPIN et al., 2019), foram selecionadas e discutidas as informações mais relevantes referentes à epidemiologia das doenças, enfatizando a sua importância para a realização do diagnóstico. Visando a aplicação prática destes conceitos, foram selecionados casos clínicos anteriormente encaminhados ao LAP/FAMEZ, os quais foram apresentados juntamente com a abordagem diagnóstica, dando destaque aos aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos, além da interpretação de exames laboratoriais complementares. Também foram incluídas informações sucintas de como coletar amostras em casos suspeitos de determinada doença e modo de armazenamento para encaminhamento das mesmas. Junto às informações escritas, um acervo de fotos foi disponibilizado, para que haja maior entendimento dos casos, rapidez no estabelecimento do diagnóstico e tratamento de animais que eventualmente estiverem doentes em determinada propriedade.

1.4. Resultados

A. *Estudo prospectivo*

Durante o período de janeiro de 2019 a janeiro de 2020, foram recebidas 775 amostras de diversas espécies animais. Destas, bovinos contabilizaram o total de 150 (19,35%), provenientes de 62 necropsias realizadas pelo LAP, oito biopsias e 80 necropsias realizadas por médicos veterinários externos à UFMS. Do total de amostras de tecidos de bovinos contabilizados, o diagnóstico conclusivo foi realizado em 97 destes (64,6%). Em relação às amostras inconclusivas (n=53, 35,3%), 73,6% (n=39) foram encaminhadas por médicos veterinários de campo e de órgãos de vigilância estaduais, 22,6% (n=12) foram provenientes de bovinos necropsiados pela equipe do LAP, e 3,8% (n=2) foram amostras de biopsia. De acordo com a classificação das enfermidades, doenças inflamatórias e parasitárias foram as mais frequentes causas de mortes e eutanásia neste período, seguidas por doenças tóxicas e toxi-infecções e doenças nutricionais ou metabólicas. Os dados estratificados estão

demonstrados na Tabela 1, a seguir. Considerou-se como surto a morte de mais de um bovino em uma mesma propriedade e em um curto período de tempo (THRUSFIELD, 2004). Os casos foram definidos como a morte de bovinos ocorrida de forma isolada.

Tabela 1. Frequência de enfermidades diagnosticadas pelo LAP/FAMEZ de janeiro de 2019 a janeiro de 2020.

Categoria	Doença	Número de casos/surtos	Número de animais	Total
Doenças inflamatórias e parasitárias	Raiva	17	29	
	Carbúnculo sintomático	4	5	
	Encefalite/meningoencefalite de causa não determinada*	5	5	
	Peritonite	2	4	
	Hemoncose	2	3	
	Abscesso vertebral	2	2	
	Babesiose cerebral	2	2	
	Septicemia	2	2	
	Sugestivo de cisticercose	2	2	
	Broncopneumonia bacteriana	1	1	62
	Bronquiolite obliterante	1	1	
	Colibacilose	1	1	
	Granuloma hepático focal	1	1	
	Meningoencefalite por Herpesvirus bovino (BoHV)	1	1	
	Salmonelose	1	1	
	Sugestivo de epidermite bacteriana	1	1	
	Tiflocolite necrosante por <i>Eimeria</i> sp.	1	1	
Doenças tóxicas e toxi-infecções	Intoxicação por <i>Stryphnodendron fissuratum</i>	3	6	
	Intoxicação por abamectina	1	4	
	Intoxicação por ureia	1	2	15
	Sugestivo de botulismo	2	2	
	Sugestivo de hepatopatia tóxica aguda	1	1	
Doenças nutricionais e metabólicas	Deficiência de cobalto	2	6	
	Acidose ruminal	1	1	7
	Carcinoma de células escamosas	2	2	

Neoplasias e lesões tumoriformes	Cisto ístmico	1	1	15
	Leucose enzoótica bovina	1	1	6
	Mixoma	1	1	
	Tecido de granulação	1	1	
Causadas por agentes físicos	Dermatite granulomatosa eosinofílica (hipersensibilidade a <i>Brachiaria</i> sp.)	1	1	
	Pneumoperitônio secundário a trocaterização	1	1	2
Outras enfermidades	Acantose e hiperqueratose epidérmica	1	1	
	Bradycardia secundária a decúbito prolongado em cirurgia	1	1	2
Doenças degenerativas	Polioencefalomalacia*	2	2	2
Distúrbios do desenvolvimento	Atresia segmentar colônica	1	1	1
Total				97

*Diagnósticos morfológicos.

Os diagnósticos mais frequentes no período estudado foram raiva, a qual foi a principal enfermidade diagnosticada, encefalites de causa não determinada e carbúnculo sintomático. Juntas, estas representaram 40,2% do total de amostras contabilizadas.

Em relação aos diagnósticos inconclusivos de amostras de tecidos remetidas por médicos veterinários de campo, os principais empecilhos para a conclusão dos mesmos incluíram o não encaminhamento de todas as partes de sistema nervoso central ou o não encaminhamento de sistema nervoso central nos casos de manifestações clínicas neurológicas, a ausência de vísceras abdominais e torácicas para a exclusão de outras enfermidades e o encaminhamento de tecidos em avançado estágio de autólise. Quanto às necropsias realizadas pela equipe do LAP, os casos inconclusivos incluíram principalmente fetos abortados e bovinos eutanasiados para controle de leucose enzoótica bovina.

C. Elaboração do material de apoio

Com base no estudo retrospectivo (PUPIN et al., 2019) e nas informações obtidas durante o período 2019-2020, as enfermidades a serem abordadas no

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/FAMEZ/UFMS

Avenida Senador Filinto Muller nº 2443-Cidade Universitária - CEP: 79070-900 – Campo Grande-MS

☎ 3345-3645 ☎ 3345-3600 ✉ civet.famez@ufms.br

material de apoio aos médicos veterinários pertencem as categorias de doenças inflamatórias e parasitárias e tóxicas e toxi-infecções, visto que foram as mais frequentes durante todo o período de estudo. São elas: raiva, meningoencefalite por BoHV, carbúnculo sintomático, botulismo e intoxicação por *Vernonia* sp. A partir destas doenças principais, visando o diagnóstico diferencial para as mesmas, também serão discutidas tristeza parasitária bovina, salmonelose entérica/septicêmica, intoxicação *Senna* sp. e antibióticos ionóforos e polioencefalomalacia. As características epidemiológicas, clinicopatológicas e laboratoriais serão, mediante as descrições disponíveis na literatura mundial e nos casos do presente estudo, incluídas nas informações do material juntas a fotos e às instruções de coleta e armazenamento das amostras de tecidos necessárias para o diagnóstico conclusivo.

O material está disponível no item A. dos anexos deste trabalho.

1.5. Discussão

Durante o período estudado, 19,35% de todas as amostras de tecidos recebidas no LAP/FAMEZ corresponderam a bovinos, encaminhadas principalmente por médicos veterinários de campo. Embora os diagnósticos conclusivos tenham sido realizados em mais de 64% das amostras, o número de diagnósticos inconclusivos foi alto (35,3%), semelhante ao observado em estudos retrospectivos anteriores (LUCENA et al., 2010; SPRENGER et al., 2015; MELLO et al., 2017; RONDELLI et al., 2017; PUPIN et al., 2019), e ocorreu majoritariamente quando as amostras de tecidos foram remetidas por médicos veterinários de campo; dentre os motivos que resultaram em um diagnóstico inconclusivo, os empecilhos mais comuns, assim como encontrado nos estudos anteriormente citados, incluíram a falta de dados clínicos e epidemiológicos associada à ausência do encaminhamento de amostras significativas de todos os órgãos, incluindo todas as partes que compõem o sistema nervoso central, principalmente nos casos em que havia história de sintomatologia clínica neurológica. Estas falhas durante a coleta de dados e de amostras de tecidos são pontos cruciais para o desfecho do processo de diagnóstico que, muitas vezes, inviabilizam a realização de um diagnóstico conclusivo (MAXIE, MILLER, 2016), como foi observado neste estudo.

Assim como no estudo retrospectivo das doenças de bovinos em Mato Grosso do Sul previamente realizado (PUPIN et al., 2019), as principais causas de morte de bovinos foram doenças inflamatórias e parasitárias, com os casos de raiva representando a maioria dos diagnósticos no período (29,8%). Nesta categoria, as encefalites de causa não determinada foi o terceiro diagnóstico morfológico mais diagnosticado, sendo oriundo de amostras de tecidos encaminhadas por médicos veterinários de campo e de animais necropsiados pela equipe do LAP-FAMEZ. Estas podem ser explicadas, em alguns dos casos, pelo não encaminhamento de partes essenciais do sistema nervoso central para o diagnóstico de determinada doença que leva à inflamação não supurativa do encéfalo (RONDELLI et al., 2017; PUPIN et al., 2019) como, por exemplo, a febre catarral maligna, meningoencefalite por BoHV e raiva. Nesta, as chances de um diagnóstico conclusivo aumentam significativamente se são encaminhadas ao LDV amostras representativas de cerebelo e os demais componentes do tronco encefálico, gânglio trigeminal e medula espinhal, uma vez que a maior parte das lesões se encontram nestes locais (LANGHOR et al., 2003). Caso estas regiões não sejam encaminhadas, muitas vezes, apenas a inflamação estará presente, e a não visualização de corpúsculos de Negri torna o diagnóstico histopatológico de difícil realização (CANTILE, YOUSSEF, 2016). Da mesma forma, além do exame histopatológico, o não encaminhamento destas regiões para a realização de imuno-histoquímica para pesquisa do antígeno da raiva, e para a realização das provas oficiais de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongo diminui as chances de atribuição das lesões visualizadas histologicamente a um agente específico (RONDELLI et al., 2017). Adicionalmente, em outros países, nos últimos anos, encefalites não supurativas com necrose neuronal, semelhantes ao descrito nos casos de raiva (LANGOHR et al., 2003) já foram atribuídas à infecção por Astrovírus (LI et al., 2013; GIANNITTI et al., 2019). Por estas razões, no presente estudo, não é possível excluir o vírus da raiva e Astrovírus como possíveis etiologias para os casos de encefalite de causa não determinada, embora a ocorrência deste último ainda não tenha sido relatado no Brasil. Testes adicionais de detecção, como imuno-histoquímica e hibridização *in situ*

(GIANNITTI et al., 2019) devem, obrigatoriamente, ser realizados para a elucidação destes casos.

Em comparação ao observado no estudo anterior (PUPIN et al., 2019), uma doença que foi diagnosticada apenas durante o presente estudo foi a deficiência de cobalto, que ocorreu sob a forma de dois surtos. Este resultado demonstra a importância da realização de levantamentos utilizando séries históricas e o acompanhamento constante de casos que são recebidos ano após ano, pois estes dois tipos de estudos permitem melhorar a eficiência no processo diagnóstico, reconhecer doenças que anteriormente não foram diagnosticadas, bem como permite o conhecimento de novos aspectos de doenças que são passíveis de ocorrência no estado, como ocorreu no caso da intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum*, a qual foi observada manifestação clínica distinta da relatada em surtos anteriores (FERREIRA et al., 2009; LAZARO et al., 2018), nos quais as lesões de fotossensibilização predominaram e não foram relatadas úlceras na cavidade oral e sialorreia excessiva, como foi encontrado nos surtos acompanhados no presente estudo.

É importante salientar que, embora essenciais, estudos de casos realizados durante apenas um ano não podem ser supervalorizados, uma vez que o tempo curto pode demonstrar a ideia de que muitas doenças são extremamente importantes no estado devido à necropsia de vários animais provenientes de um mesmo surto, como foi o caso da deficiência de cobalto e da intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum*. Por isso, estes estudos devem sempre estar atrelados a séries históricas, pois só assim poderá ser visualizada a real proporção da frequência de ocorrência das doenças diagnosticadas naquele ano, se elas são motivo de real preocupação ou se são de ocorrência esporádica. Em um surto de tétano ocorrido no Rio Grande do Sul (DRIEMEIER et al., 2007), um total de 297 bovinos e 50 ovinos morreram em um curto período de tempo após a aplicação de vermífugo contaminado com as toxinas de *Clostridium tetani*. Nestes casos, quando são realizados estudos de levantamentos, a interpretação é essencial, pois é importante que se saiba que a grande quantidade de casos ocorridos pode ter sido decorrente de um único surto e não representa a real frequência que a doença ocorre na região.

1.6. Conclusão

Doenças inflamatórias e parasitárias continuam sendo as principais causas de morte de bovinos em Mato Grosso do Sul, com destaque, dentre estas, para a raiva. A falha na metodologia do encaminhamento de amostras de tecidos de bovinos para o exame histopatológico foi o principal motivo que levou ao alto número de diagnósticos inconclusivos neste estudo.

1.7. Referências bibliográficas

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil. 2019. 49p. Disponível em <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Departamento de Defesa Animal. 2003. 50p. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 10 de janeiro de 2020.

CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: Maxie, M.G. (ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.** St. Louis, Missouri: Elsevier, p.251-406, 2016.

FERREIRA, E.V.; BOABAID, F.M.; ARRUDA, L.P.; LEMOS, R.A.A.; SOUZA, M.A.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E.M. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosidae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.11, p.951-957, 2009.

FIGUEIREDO, A.P.M.; FRARI, M.G.; ZAPPA, V. História da febre aftosa no Brasil. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, n.13, p.1-4, 2009.

GIANNITTI, F.; CAFFARENA, R.D.; PESAVENTO, P.; UZAL, F.A.; MAYA, L.; FRAGA, M.; COLINA, R.; CASTELLS, M. The first case of bovine Astrovirus-associated encephalitis in the southern hemisphere (Uruguay), uncovers evidence of viral introduction to the Americas from Europe. **Front. Microbiol.**, v.10, p.1-8, 2019.

HECKLER, R.F.; LEMOS, R.A.A.; GOMES, D.C.; DUTRA, I.S.; SILVA, R.O.S.; LOBATO, F.C.F.; RAMOS, C.A.N.; BRUMATTI, R.C. Blackleg in cattle in the state Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. **Pesq. Vet. Bras.**, v.38, n.1, p.6-14, 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. 2017. 8p. Disponível em

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

LANGHOR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Cienc. Rural**, v.33, p.125-131, 2003.

LAZARO, D.N.; BACHA, F.B.; PUPIN, R.C.; PAULA, J.P.L.; LEAL, P.V.; POTT, A.; GOMES, D.C.; LEMOS, R.A.A. Photosensitization in cattle caused by spontaneous and experimentally ingestion of *Stryphnodendron fissuratum*. **Acta Sci. Vet.**, v.46, p.1-8, 2018.

LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil**. 2005. 150p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus Jaboticabal, São Paulo.

LEMOS, R.A.A. **Prefácio**. In: I ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 1996. p.9.

LI, L.; MCGRAW, S.; BARR, B.; TRASLAVINA, R.; HIGGINS, R.; TALBOT, T.; BLANCHARD, P.; RIMOLDI, G.; FAHSBENDER, E.; PAGE, B.; PHAN, T.G.; WANG, C.; DENG, X.; PESAVENTO, P.; DELWART, E. Divergent Astrovirus associated with neurologic disease in cattle. **Emerg. Infect. Dis.**, v.19, n.9, p.1385-1392, 2013.

LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n. 5, p.428-434, 2010.

MELLO, L.S.; BIANCHI, M.V.; BANDINELLI, M.B.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D.; PAVARINI, S.P. Causas de morte em vacas leiteiras no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v.37, n.9, p.916-920, 2017.

OMS – Organização Mundial da Saúde, Organização Pan Americana da Saúde. **Situação dos programas de erradicação da febre aftosa. América do Sul**. Rio de Janeiro: Centro Pan Americano de Febre Aftosa, 2000. 47p.

PUPIN, R.C.; LEAL, P.V.; PAULA, J.P.L.; GUIZELINI, C.C.; MÖCK, T.B.M.; LEMOS, R.A.A.; GOMES, D.C. Cattle diseases in Mato Grosso do Sul, Brazil: a 24-year survey (1995-2018). **Pesq. Vet. Bras.**, v.39, n.9, p.686-695, 2019.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J.C.; LUCENA, R.B.; CARMO, P.M.S.; BARROS, C.S.L. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.11, p.958-967, 2010.

RONDELLI, L.A.S.; SILVA, G.S.; BEZERRA, K.S.; RONDELLI, A.L.H.; LIMA, S.R.; FURLAN, F.H.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. Doenças de bovinos em Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). **Pesq. Vet. Bras.**, v.37, n.5, p.432-440, 2017.

SCHULZ, L.L.; HAYES, D.J.; HOLTKAMP, D.J.; SWENSON, D.A. Economic impact of university veterinary diagnostic laboratories: a case study. **Prev. Vet. Med.**, v.151, p.5-12, 2012.

SOARES, M.C.; PUPIN, R.C.; GUIZELINI, C.C.; GASPAR, A.O.; GOMES, D.C.; BRUMATTI, R. C.; LEMOS, R.A.A. Economic losses due to *Vernonia rubricaulis* poisoning in cattle. **Pesq. Vet. Bras.**, v.38, n.12, p.2217-2223, 2018.

SPRENGER, L.K.; RISOLIA, L.W.; GABARDO, L.B.; MOLENTO, M.B.; SILVA, A.W.C.; SOUSA, R.S. Doenças de ruminantes domésticos diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná: 1075 casos. **Arch. Vet. Sci.**, v.20, n.4, p.45-53, 2015.

2. CAPÍTULO II

2.1. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves

Carolina C. Guizelini¹, Juliane F. Tutija², Dayane R. Morais¹, Flávia B. Bacha³, Carlos A. N. Ramos⁴, Cássia R. B. Leal², Maria E. Zaquetti³, Ricardo A.A. Lemos^{1*}

Artigo submetido à revista Journal of Infection in Developing Countries, publicado em janeiro de 2020 e escrito conforme as normas da mesma.

¹Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Brazil

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS Brazil

³Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Dourados, MS, Brazil

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS Brazil

Abstract

Introduction: An early and accurate diagnosis of septicemic salmonellosis is critical for implementing timely and proper treatment, prevention, and control measures.

Methodology: Here, we report a study on three outbreaks of septicemic salmonellosis in calves from Midwestern Brazil.

Results: the morbidity, mortality and lethality rates were of 10.55%, 2.79%, and 26.4%, respectively. Higher susceptibility was detected in *Bos taurus* than in *Bos indicus* cattle. Clinical manifestations consisted of apathy, hyperthermia, difficulty breathing and panting, and pallor of the mucous membranes. Chronic cases had necrosis of the tail tip and ears. Gross findings included enlarged liver, non-collapsed edematous lungs and diphtheritic enteritis. Significant histopathological changes included paratyphoid nodules in the liver and acute interstitial pneumonia. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Dublin was detected by culture and by

PCR from the blood of live calves, and from the spleen, liver, bile, mesenteric lymph node and lung samples of necropsied calves.

Conclusions: We suggest that in clinical cases of septicemic salmonellosis, blood samples are better than fecal samples for detection of the agent, being a sound test to identify animal carriers in the herd.

Key words: *Salmonella* Dublin; *Bos Taurus*; carrier; blood; culture; PCR.

Running title: Diagnosis of bovine septicemic salmonellosis

Introduction

Bovine salmonellosis is responsible for causing severe economic losses due to high mortality, especially in cases of the septicemic form caused by *Salmonella enterica* serotype Dublin (for conciseness, hereafter referred to as *Salmonella* Dublin or *S.* Dublin). Early and accurate diagnosis of this type of salmonellosis presentation is critical to allow veterinary practitioners to implement proper treatment, prevention, and control measures [1]. One of the main characteristics of *Salmonella* Dublin is its ability to induce a carrier state in cattle, in which bacteria are then shed intermittently throughout life [2]. Carriers are one of the primary sources of infection, and their recognition and identification, although challenging to perform, are essential to control salmonellosis in a herd [2,3]. Usually, the detection of the bacterium in live animals is performed through fecal microbiological culture [4,5]. However, due to the intermittent bacterial shedding in the feces, false negatives can occur, which might be a source of further outbreaks. A diagnostic method to detect carriers of *S.* Dublin is therefore desirable. Here, we report a study of three outbreaks of septicemic salmonellosis in calves and suggest a diagnostic protocol for the identification of carrier cattle.

Methodology

Three outbreaks occurred on three different farms. Data on the outbreaks were provided by the veterinary practitioners who supervised the farms. Additionally, over five months, the authors made five on-site visits to the farms to gather epidemiological data and to perform necropsy and sample collections from live and necropsied calves.

Outbreaks were numbered 1-3 chronologically.

Of all outbreaks, among all calves that died spontaneously, five were necropsied, and fragments of several organs were sampled and stored in 10% formalin solution for further routine processing for histopathology. Samples of liver, intestine loops, intestinal contents, lung, and bile were stored separately for microbiological culture.

In two calves, spleen smears were performed and stained using DiffQuick® (Siemens Healthcare Limited, Camberley, UK) stain for hematozoa. A detailed clinical examination was carried out in 60 calves with clinical signs compatible with salmonellosis; blood samples were obtained by jugular puncture and stored in two types of Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company – BD, New Jersey, USA), one containing EDTA. Feces were sampled using swabs from the rectal ampulla in a tube containing Stuart medium. All samples were refrigerated at 4°C until the bacteriological culture was performed using MacConkey agar (Prodimol Biotecnology, Belo Horizonte, Brazil, for fecal samples) and Hemoprov II pediatric® (Newprov, Pinhais, Brazil, for blood samples) media. Fecal samples were cultured on MacConkey and incubated at 37°C for 24 hours. Subsequently, colorless colonies were identified using Gram-stain and specific biochemical tests for enterobacteria (catalase, oxidase and urease activity, sugar fermentation, citrate utilization, motility, indole production). Samples, whose

biochemical profile was compatible with the genus *Salmonella*, were submitted to the rapid slide agglutination test. Blood samples were cultured on Hemoprov II pediatric® at 37°C for 24 hours. After this time an aliquot from the culture was transferred for BHI (brain heart infusion) agar and placed at 37°C for 24 hours. Then, colonies were cultured on MacConkey and incubated at 37°C for 24 hours. Colorless colonies were identified as previously mentioned.

All cultures that yielded organisms with biochemical characteristics of the genus *Salmonella* were submitted to DNA extraction by thermolysis [6], followed by specific Polymerase Chain Reaction (PCR) to *S. Dublin* using the primer set pDm10-F (5'-GGGCTGGTTCTGAAAGGTGTTA-3') and pDm10-R (5'-ACTGAAGTTGTATCGGGTGGTC-3'), which delimits a 463 bp fragment of a gene encoding a hypothetical protein as previously described [7]. The PCR products were observed under ultraviolet light after electrophoresis in 2% agarose gel stained with GelRed® (Biotium, Landing Parkway Fremont, USA) according to the manufacturer's instructions. A 100 bp DNA ladder was used to measure the amplified fragments.

The morbidity, mortality and lethality rates were calculated based on the number of calves at risk, which was defined as the total of calves that remained in the same environment as the affected calves [8].

Results

The three outbreaks occurred in Midwestern Brazil, in two counties in Mato Grosso do Sul (MS) state, namely Amambai (latitude 23°06'15" south, longitude 55°13'33" west) and Juti (latitude 22°51'38" south, longitude 54°36'10" west). The three farms adopted an extensive system with rotational grazing to raise cattle. The lots consisted of calves from Nelore (*Bos indicus*) and European (*Bos taurus*) mixed breeds between 30 and 90

days of age. Nelore calves did not become ill, although they were held in the same pastures as the European mixed-breed calves. The total number of calves in the three farms was 2860, 860 Nelore and 2000 European mixed breeds; 302 became ill, and 80 died, indicating morbidity, mortality and lethality rates of 10.55%, 2.79%, and 26.4%, respectively.

Clinical manifestations consisted of apathy, hyperthermia, difficulty breathing and panting, and pallor of the mucous membranes. A few calves developed mild yellow and fetid diarrhea. Several calves were found dead. Others had a fatal clinical course of 1-2 days. Affected calves were treated with single doses of ceftiofur (4 mL/calf) and dipyron (5 mL/calf). Several calves recovered after treatment, and some recovered cases presented necrosis of the tail tip and ears.

Bacteriological fecal and blood samples from 60 calves were negative. Twenty of those were healthy calves, and the remaining 40 were from calves that had developed clinical signs of salmonellosis. Blood culture from seven calves, of which one had recovered from the clinical disease and six were sick, yielded *Salmonella* in pure culture. Of these seven positive cases, *S. Dublin* was identified in four (Table 1). There was no growth of this agent in any of the 60 fecal samples.

Table 1. Results for bacterial culture and PCR from calves with Salmonellosis

Calf	Blood culture	PCR	Comments
A	<i>Salmonella</i>	<i>S. Dublin</i>	Recovered after treatment
B	<i>Salmonella</i>	<i>S. Dublin</i>	NI
C	<i>Salmonella</i>	ND	Treated one day before sampling
D	<i>Salmonella</i>	<i>S. Dublin</i>	Treated 12 days before sampling
E	<i>Salmonella</i>	ND	Treated 12 days before sampling; necrosis of the tail tip and ear

F	<i>Salmonella</i>	ND	Clinical signs manifested one day before sampling
G	<i>Salmonella</i>	<i>S. Dublin</i>	Clinical signs manifested one day before sampling

ND = not done; NI = not informed.

Five calves (one from Farm 1, one from Farm 2 and three from Farm 3) were necropsied. Gross findings were similar in all necropsied cattle and consisted of an enlarged liver with rounded edges and multiple yellowish or hemorrhagic areas on the capsular surface (Figure 1); gelatinous edema in the gallbladder wall and non-collapsed lungs with smooth and bright pleura surfaces and gelatinous edema in the interlobular pulmonary septa. In the intestinal lumina, fibrin clots were adhered to the mucosa (diphtheritic enteritis) (Figure 2).



Figure 1. Salmonellosis in calf. The lungs are non-collapsed and are diffusely red. The liver is enlarged, with multiple orange foci at the capsular surface.



Figure 2. Salmonellosis in calf. The cecal content is dark brown and has big clots of fibrin.

The histopathological lesions were also similar in all five necropsied calves. In the liver, there were multiple randomly distributed minute nodules consisting of necrosis associated with neutrophilic and macrophagic infiltrates (paratyphoid nodules) (Figure 3).

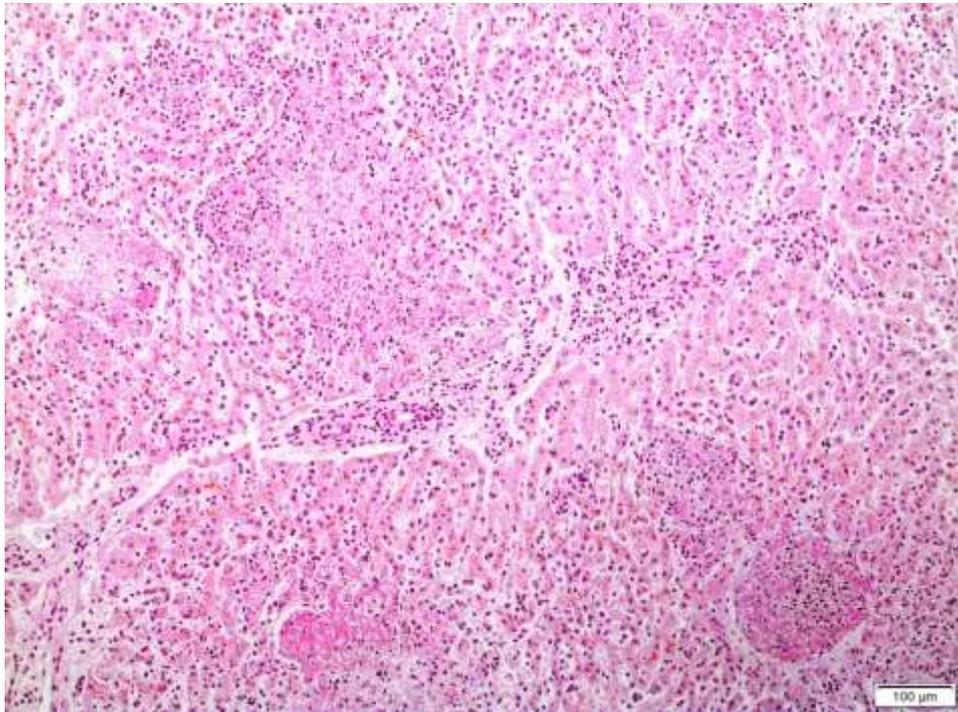


Figure 3. Salmonellosis in calf. In the liver, there are multiple random foci of necrosis with fibrin, necrotic debris, neutrophils and a few macrophages. Fibrin thrombi are seen in vessels walls. The sinusoids and the cytoplasm of hepatocytes are filled with bile pigment. H&E, 10x.

The histopathological lesions were also similar in all five necropsied calves. In the liver, there were multiple randomly distributed minute nodules consisting of necrosis associated with neutrophilic and macrophagic infiltrates (paratyphoid nodules) (Figure 3). Some small hepatic arteries were thrombosed. In the lungs, there was thickening of the lobular and interstitial pulmonary septa by dense fibrin bundles, moderate to severe infiltrate of macrophages and neutrophils, and alveolar edema (Figure 4). Foci of necrosis with fibrin, cellular debris and neutrophils were seen in spleen (Figure 5).

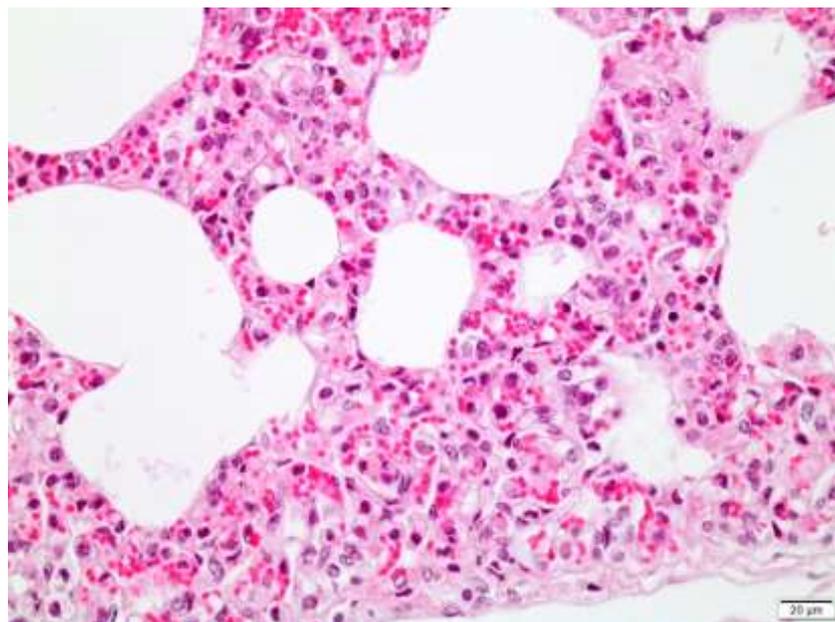


Figure 4. Salmonellosis in calf. In the lungs, alveolar septa are thickened due to infiltrate of macrophages, lymphocytes and plasma cells. Fibrin clots are seen in some alveolar lumen. H&E, 40x.

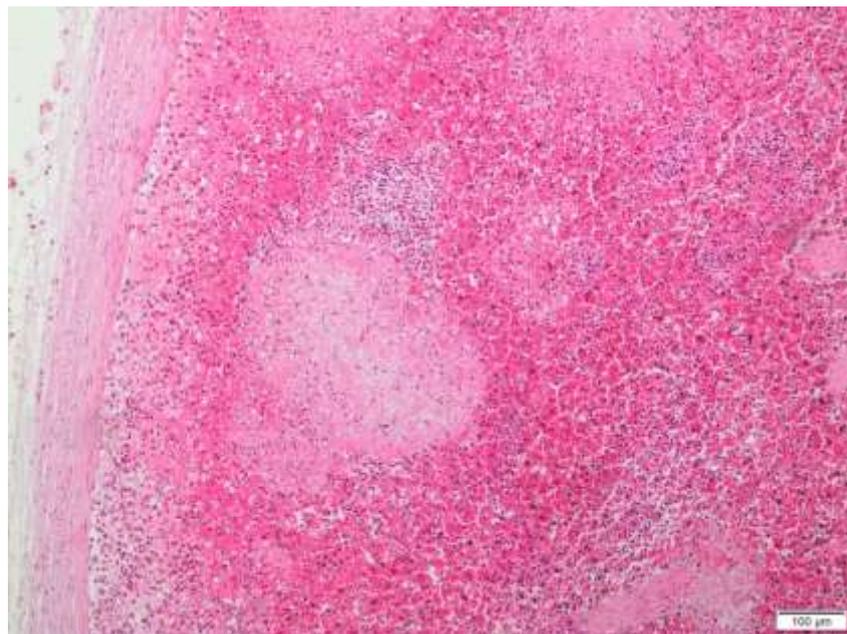


Figure 5. Salmonellosis in calf. The parenchyma is disrupted by multiple extensive foci of necrosis with fibrin deposition. H&E, 10x.

Bacterial clusters were associated with the lesions in the lymph nodes, spleen and cecum. *Salmonella* was cultured from spleen, liver, bile, mesenteric lymph node and lung samples from the five necropsied calves and identified as *S. Dublin* by PCR.

Discussion

The diagnosis of septicemic salmonellosis was based on clinical and pathological findings and confirmed through microbiological culture and identification of *S. Dublin* by the PCR technique. The diagnosis followed the criteria recommended by others [9-11].

Only calves aged between 30 and 90 days became ill, and PCR detected Dublin as the serotype involved in the outbreaks. The age group was one of the risk factors for the disease since *S. Dublin* is an established cause of diarrhea and septicemia in calves within this age range [12,13]. Considering that the farms' breeding systems are extensive, factors like clustering of calves with different ages and the stress caused by environment factors (e.g. high environment temperature) may be considered, in this

study, as potential causes for the disease occurrence, since these contribute to the decreased immunity levels of the calves in age of risk [14,15]. The clinical signs manifested by the calves in the outbreaks reported here are characteristic of those produced by this serotype, which may induce a disease in which diarrhea is absent and signs of respiratory distress predominate, as observed in the calves of the outbreaks reported here [13,16,17]. The necrosis and slough of the tail tips and ear that were observed in some calves of this report are chronic changes of septicemic salmonellosis, possibly resulting from immunomediated host reactions [9]. The necropsy and histopathological findings were similar to those observed in outbreaks previously described [1,10,11,13].

The microbiological culture of mesenteric lymph nodes, spleen, liver, lung, and bile of the necropsied calves yielded bacteria of the genus *Salmonella*. These are considered samples of choice for postmortem *Salmonella* isolation [5]. In antemortem attempts at diagnosis (blood and fecal cultures) in our study, *Salmonella* was isolated and identified only in the blood samples from calves both in the acute phase of the disease and recovered from salmonellosis. Although the blood of live animals is also indicated as an adequate sample for *Salmonella* isolation [5], in several reports, this procedure has not been attempted [1,9,13]. In the current study, blood was a useful tool for the antemortem diagnosis of septicemic salmonellosis. The negative result in fecal samples can be explained in three possible ways: (i) Most of the time, calves with septicemic salmonellosis without enteric clinical signs do not shed the bacterium in the feces since it does not colonize the intestines [17]. (ii) Calves that are carriers may not shed the bacterium in the feces or may shed it intermittently; the agent will then only be detected when it is shed in the feces [2]. (iii) Diarrhea may dilute out a particular load of bacteria in the feces to an insignificant load for microbiological culture to detect [10].

Identification of the bacteria in the blood of the calves recovered with signs of recurrence is an indication of the presence of carrier calves in the herd [2]. However, because the bacterium was not demonstrated in the feces, we were unable to identify the route of bacterial shedding during the outbreaks. Vaginal discharge, saliva and urine are also paths for *Salmonella* shedding. Flies may also be involved in transmission between animals [2,18]. Thus, we cannot rule out any of this transmission mode of the disease in the present outbreak.

Antimicrobial agents are usually not indicated as a treatment due to reports of induced resistant *Salmonella* strains [17,18]. However, treatment with antimicrobials resulted in a complete recovery of several calves in this study, although relapses occurred in some cases. In cases of large outbreaks, this may be a useful measure for reducing calf mortality.

The results of this study and previously cases [1,19] show that septicemic salmonellosis is endemic in Brazil and may cause high losses to the livestock. Due to its zoonotic character, in our country, salmonellosis is a disease that has official surveillance guidelines only in aviculture [20], despite its also being a potential cause of economic losses in beef cattle.

Conclusion

In clinical cases of septicemic salmonellosis, blood samples are better than fecal samples for the detection of *Salmonella*, and blood culture is a good test to identify animal carriers in the herd.

Acknowledgements

This study was partially funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul.

One of the authors (Lemos R.A.A.) had a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (309074/2018-5).

Role of the funding source

The sponsor had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data.

Conflict of interest: no conflict of interests is declared.

References

1. Marques ALA, Simões SVD, Garino Jr F, Maia LA, Silva TRD, Riet-Correa B, Lima EF, Riet-Correa F (2013) Outbreak of salmonellosis by serovar Dublin in calves in the State of Maranhão, Brazil. *Pesq Vet Bras* 33: 983–988. [Article in Portuguese].
2. Nielsen LR (2013) Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol* 162: 1–9
3. Hughes LE, Gibson EA, Roberts HE, Davies ET, Davies G, Sojka WJ (1971) *Bovine salmonellosis* in England and Wales. *Br Vet J* 127: 225–238
4. Wray C (1991) Salmonellosis in cattle. *In Pract* 13: 13
5. Holschbach CL, Peek SF (2018) Salmonella in dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 34: 133–154
6. Zhai L, Kong X, Lu Z, Lv F, Zhang C, Bie X (2014) Detection of *Salmonella enterica* serovar Dublin by polymerase chain reaction in multiplex format. *J Microbiol Methods* 100: 52–57.

7. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P (2001) High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1901–1906.
8. Thrusfield MV (2004) Describing disease occurrence. In: Thomas CC, editor. *Veterinary Epidemiology*. Roca, São Paulo. 46-74.
9. Loeb E, Toussaint MJ, Rutten VP, Koeman JP (2006) Dry gangrene of the extremities in calves associated with *Salmonella* dublin infection; a possible immune-mediated reaction. *J Comp Pathol* 134: 366–369
10. Constable PP, Hinchcliff HW, Done SH, Grünberg W (2017) Salmonellosis in ruminant and horses. In Constable PP, Hinchcliff HW, Done SH, Grünberg W, editors. *Veterinary Medicine—A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses*. Philadelphia: Elsevier. 357–373.
11. Costa RA, Casaux ML, Caffarena RD, Macias-Rioseco M, Schild CO, Fraga M, Riet-Correa F, Giannitti F (2018) Urocystitis and ureteritis in Holstein calves with septicemia caused by *Salmonella enterica* serotype dublin. *J Comp Pathol* 164: 32–36
12. Blanchard PC (2012) Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 443–464.
13. Pecoraro HL, Thompson B, Duhamel GE (2017) Histopathology case definition of naturally acquired *Salmonella enterica* serovar Dublin infection in young Holstein cattle in the northeastern United States. *J Vet Diagn Invest* 29: 860–864
14. Vaessen MA, Veling J, Frankena K, Graat EAM, Klunder T (1998) Risk factors for salmonella Dublin infection on dairy farms. *Vet Quart* 20: 97-99.

15. Mohler VL, Izzo MM, House JK (2009) Salmonella in Calves. *Vet Clin Food Anim* 25: 37-54.
16. Carrique-Mas JJ, Willmington JA, Papadopoulou C, Watson EN, Davies RH (2010) *Salmonella* infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. *Vet Rec* 167: 560–565
17. La Ragione R, Metcalfe HJ, Villarreal-Ramos B, Werling D. (2013) Salmonella infections in cattle. In Barrow PA, Methner U, editors. *Salmonella in Domestic Animals*. Oxfordshire: CABI. 233–262.
18. Xu Y, Tao S, Hinkle N, Harrison M, Chen J (2018) *Salmonella*, including antibiotic-resistant *Salmonella*, from flies captured from cattle farms in Georgia, U.S.A. *Sci Total Environ* 616-617: 90–96
19. Guizelini CC, Pupin RC, Leal CRB, Ramos CAN, Pavarini SP, Gomes DC, Martins TB, Lemos RAA (2019) Salmonellosis in calves without intestinal lesions. *Pesq Vet Bras* 38: 580-586.
20. (2016) Normative Instruction n°20, from october 21st of 2016. Ministry of Agriculture, Cattle and Supplying, Brazil.[Article in Portuguese].

2.2. Blackleg in inadequately immunized calves and their recovery following antibiotic therapy

Carolina C. Guizelini¹, Otávio A. C. Silvestre², Carlos A. N. Ramos³, Danilo C. Gomes², Ricardo A. A. Lemos²

Artigo submetido à revista Journal of Infection in Developing Countries e escrito conforme as normas da mesma.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Campo Grande, Brazil.

²Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Campo Grande, Brazil.

³Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Campo Grande, Brazil.

Abstract

Introduction: There is consensus regarding the importance of blackleg vaccination as a preventive measure, and proper immunization protocols are available. However, few studies have evaluated the effectiveness of vaccine protection against *Clostridium chauvoei* and the treatment of the disease in calves exhibiting early or advanced clinical courses. This study describes twelve blackleg cases in unvaccinated calves and in calves that received a single dose of the vaccine. It also reports the recovery of some calves

after antibiotic therapy.

Methodology: Two necropsies of cattle dead from blackleg were performed. Fragments of skeletal muscle from these two cattle were immersed in paraffin for multiplex polymerase chain reaction (PCR) analysis.

Results: Twelve calves up to nine months of age developed signs of blackleg and eight died. Ten of those 9-month-old calves had received only the first dose of a blackleg vaccine at 4 months of age, but no booster. The last two affected calves belonged to a herd that had never been vaccinated. Four out of five calves treated with penicillin for 6-7 days, recovered from the disease. The diagnosis of blackleg was based on necropsy, histopathological findings and detection of *C. chauvoei* in skeletal muscle samples of two necropsied calves using PCR.

Conclusions: The occurrence of cases only in calves that did not receive a booster dose or were not vaccinated indicated that the vaccine used was effective when performed as recommended by the manufacturer. However, neglecting the booster resulted in casualties due to blackleg.

Key words: *Clostridium chauvoei*; cattle disease; clostridial disease; blackleg; immunization.

Running title: Inadequately immunized and recovered calves after treatment for blackleg

Introduction

Blackleg is caused by histotoxins of *Clostridium chauvoei*, an anaerobic spore-forming bacterium. It is primarily a disease of cattle with characteristic lesions of hemorrhagic and emphysematous necrotic myositis and myocarditis [1,2,3,4,5]. Vaccination against

blackleg is recommended for 3-6-month-old calves, followed by a booster dose within 30 days, and annual revaccination until cattle reach three years of age [6]. However, in large herds held in extensive areas, farming can be a demanding operation in which booster doses may be neglected, increasing the risks of blackleg to occur [5,7].

An alternative vaccination protocol which grants an adequate protection against blackleg is to vaccinate calves at 4 and 8 months of age. In general, the second (booster) dose will coincide with the weaning season [7].

There is common knowledge about the importance of vaccination in protecting cattle from blackleg, and the vaccination protocols available are considered effective [6,8,9]. Nevertheless, few studies evaluate the efficacy of immunization against *C. chauvoei* [4] or the treatment of cattle that show early and advanced clinical signs [10].

This study describes cases of blackleg in unvaccinated calves and calves vaccinated with a single dose. Additionally, we describe the recovery of some of these calves after treatment with penicillin and steroidal anti-inflammatory drugs.

Methodology

The data from the cases were gathered during an on-site visit to the affected property and interviewing the attending veterinarian.

One blackleg affected calf (Calf 1) was referred to the Veterinary Teaching Hospital at the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HV-UFMS). Due to poor prognosis, the calf was euthanized and necropsied. Another affected calf (Calf 2) was found dead at the premises and necropsied during a visit to the farm. Thorough necropsies and tissue sampling were performed according to published recommendations [11]. Fragments of several organs from both necropsied calves were

sampled and fixed in 10% formalin. They were routinely processed for histopathology and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Fragments of quadriceps femoris and masseter skeletal muscles were sampled respectively from Calves 1, and 2 from areas of characteristic blackleg lesions. These fragments were immersed in 56°C paraffin to maintain an anaerobic environment [10]; they were then refrigerated at 5°C for 20 days after which were analyzed for *C. chauvoei* and *C. septicum* using multiplex PCR techniques [12].

Calves with clinical signs of blackleg were treated with 2-6,000,000 UI/calf of penicillin (Pencivet® Plus, Merck Animal Health, Millsboro, USA) and 0.11mg/kg of dexamethasone (Azium®, Merck Animal Health, Millsboro, USA).

Results

The cases of blackleg occurred in a farm, in which there 2.339 Nelore calves and 12 dairy calves of Girolando breed. These cattle were maintained in four holdings, identified here as Holdings 1-4 (Table 1).

Table 1. Calves at risk of contracting blackleg as distributed in their holdings, their vaccination schedules, and the morbidity and mortality per holding.

Holding	Number of calves in the holding	Breed	Vaccination at 4 months of age	Second dose 4 months later	Number of calves affected by Blackleg	Number of affected calves that died
1	119	Nelore	Yes	No	12	8
2	600	Nelore	Yes	Yes	None	None
3	12	Girolando	No	No	2	2
4	1,620	Nelore	Yes	No	None	None

Calves were nine-month-old except for those in Holding 4 that were 5-7-month old. Different erratic vaccination protocols against blackleg were applied to the calves but always using the same commercial polyvalent vaccine consisting of *C. chauvoei*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* and *C. sordelii* strains. Except for the calves at the Holding 3, all calves received the first dose of the vaccine at four months of age. The booster dose was scheduled for four months later, at the weaning season; however, this was done only in calves of Holding 2.

Twelve calves were affected by blackleg in Holding 1 and two in Holding 3. No calves were affected in Holdings 2 and 4.

After the first diagnosis of blackleg, all of the other calves in the four holdings were vaccinated against blackleg.

Five calves affected by blackleg (four in Holding 1 and two in Holding 3) were treated for 6-7 days with penicillin and dexamethasone as described in the Methodology section. Four calves in Holding 1 recovered. As there were 2.531 calves at risk (considering the four holdings together), the morbidity, mortality, and lethality rates were respectively 0.51%, 0.34%, and 66.6%.

Observed clinical signs in blackleg affected cattle included stagger, apathy, stiff limbs with compromised locomotion, evolving to decubitus and death within two days of the onset of the clinical signs; large muscle groups were swollen and crepitating. Two calves were found dead without premonitory signs. One calf (Calf 1) was necropsied at HV-UFMS and another (Calf 2) at the farm.

In the necropsy of Calf 1 the gross lesions in the skeletal muscles were marked and observed on the right quadriceps femoris, semimembranosus, gracilis, popliteal, and diaphragm. Muscle lesions consisted of focal extensive crepitating dark red or black

areas permeated by varying-sized gas bubbles, edema, and hemorrhage (Figure 1).



Figure 1. Blackleg in cattle. Skeletal muscle. There are focal extensive dark areas of focal extensive hemorrhagic and emphysematous necrosis.

Such affected areas exhaled a strong butyric odor. The thoracic cavity contained a moderate amount of serosanguinous fluid containing floating fibrin clots. The visceral pleura was covered by a fibrin film (Figure 2) that loosely adhered to multiple foci of the visceral to parietal pleura. The pericardial sac (Figure 3) was distended by moderate fluid containing fibrin.

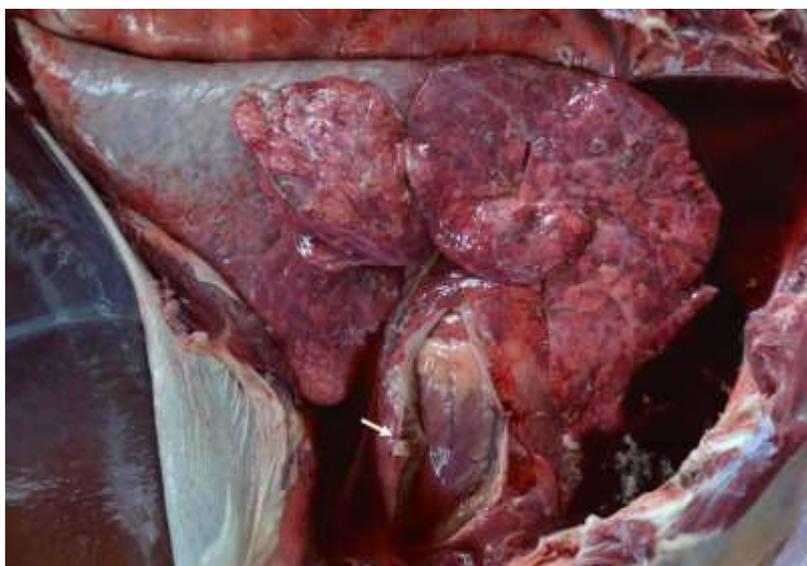


Figure 2. Blackleg in cattle. Thoracic cavity. The right hemithorax is filled with a serosanguinous fluid admixed with fibrin. Fibrin clots are over multiple spots on the pleura. The pericardial sac is distended by fluid and fibrin (arrow).



Figure 3. Blackleg lesions in cattle. Big clots of fibrin are on multiple areas of the epicardium, associated with numerous small foci of hemorrhage.

In the necropsy of Calf 2, the muscular lesions were similar but mild affecting skeletal muscles of the dorsal, flank areas, and the masseter. The large muscle groups of the limbs were spared.

Microscopically, the myofibers were hypereosinophilic and moderately swollen (hyalin necrosis); the perimysium and endomysium were somewhat expanded by a faint eosinophilic material (edema) rich in fibrin (Figure 4). In addition to necrosis, there was extensive hemorrhage, multiple discrete vacuoles (gas bubbles), and a few aggregates of strongly basophilic bacilli. Occasionally, the tunica media and tunica adventitia of arterioles were moderately distended by the deposition of fibrillar, acellular, and highly eosinophilic material (fibrinoid necrosis).

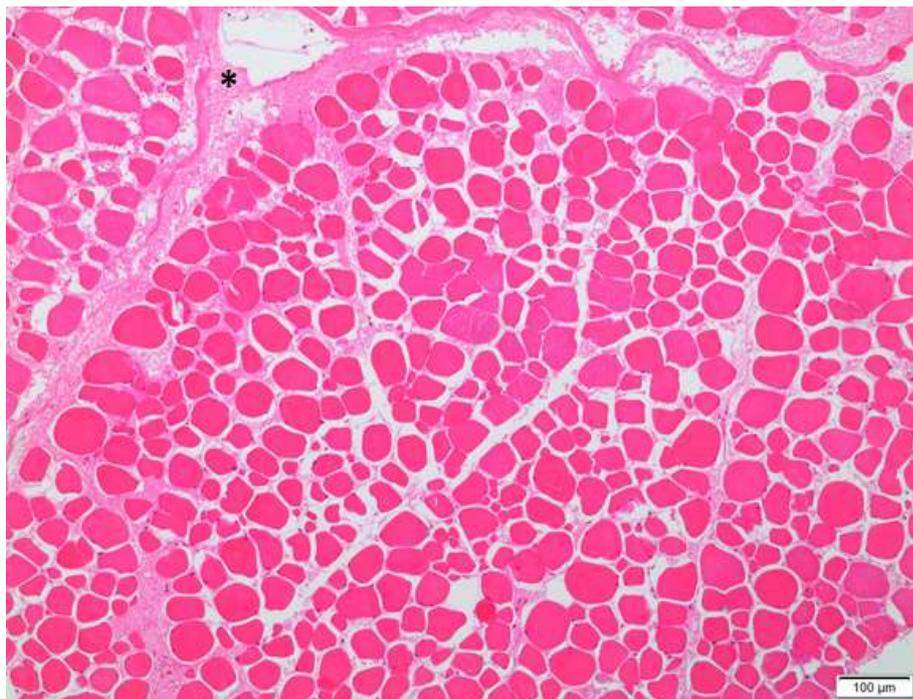


Figure 4. Blackleg in cattle. Skeletal muscle. The myofibers are hypereosinophilic and moderately swollen (hyalin necrosis). The space between the fibers is somewhat expanded by a faint pink material, which is edema rich in fibrin with some (asterisk) erythrocytes H&E, 10x.

C. chauvoei was identified by PCR analysis from several fragments of quadriceps femoris muscle of Calf 1 and several fragments of masseter muscle of Calf 2.

Discussion

The diagnosis of blackleg was based on the clinical, epidemiological, and anatomopathological findings. Those were similar to characteristic results reported elsewhere for the disease [3,5,6]. The diagnosis was further confirmed by PCR analysis of skeletal muscle samples from Calves 1 and 2. *C. chauvoei* DNA amplification is an excellent alternative to prove the agent due to the difficulty of its isolation via microbiological culture [4,13].

The characteristic necro-hemorrhagic and emphysematous myositis [9,10] was observed in both necropsied calves; however, they differ in location and severity. In contrast to Calf 1, in which the large muscular groups were severely affected, muscular

lesions were mild in Calf 2 and spared the large muscle groups of the limbs. Also, the fibrinous pleuritis and pericarditis observed in Calf 1 were absent in Calf 2. This finding demonstrates the importance of a detailed necropsy for an accurate diagnosis since lesions are not always conspicuous and prone to be neglected. An early diagnosis based upon gross lesions was critical in controlling the disease since it allowed the identification and treatment of sick animals in early clinical stages, resulting in the complete recovery of four calves. A delay in diagnosis is a potential cause of substantial losses, whereas an early diagnosis prompts the adoption of preventive measures and treatment of sick animals [3].

Affected calves were in the age range of blackleg occurrence [10]. Most of the calves were vaccinated with a single dose when 4-month-old, without the recommended booster, four months after that. However, there are pieces of evidence suggesting that a protocol of vaccination at four months of age with a booster at eight months of age induces a satisfactory immunization against blackleg in cattle [7].

In the current study, blackleg occurred only in calves that were not vaccinated with a booster dose, or that were not vaccinated at all. Also, there were no cases of blackleg in calves vaccinated at four and eight months of age, according to a recommended protocol [7]. These data suggest that the vaccine used on this farm is an efficient prophylactic tool when the correct vaccination protocol is applied.

Although vaccination against blackleg is a common practice, there are few studies on vaccine efficacy [14]. In a previous study including 59 cases of the disease [10], only two affected calves had correctly been vaccinated. In one farm, vaccinated and unvaccinated calves were kept in the same pen, and only the latter were stricken by blackleg. This data reinforces the importance of a correct vaccination.

The pathogenesis of blackleg initiate by the ingestion of bacterial spores that are

absorbed in the intestine to the bloodstream and distributed to the skeletal musculature; there, they remain latent until there is local hypoxia caused by blunt trauma. The decreased oxygen level favors spore germination and proliferation, with the production of virulence factors [4]. Considering this, when cattle live in areas where there is disseminated contamination of *C. chauvoei*, vaccination is the only means to prevent the disease [4]. This assertion is reinforced by the occurrence of blackleg in dairy calves that did not have any contact with the sick calves from other holdings.

Five calves were treated, and four recovered. Although, in the majority of cases, blackleg exhibits a lethality rate near 100% [8], such lethality did not occur in the cases of this study. Four calves diagnosed early in the clinical course of blackleg, experienced full recoveries, while the one that died despite treatment was diagnosed in an advanced clinical stage, corroborating the assertion that successful treatment depends on an early diagnosis [8].

In our therapy trials, clinical signs continued for up to seven days, and the treatment had to be maintained until complete recovery, to prevent relapses. After curative treatment was achieved in some sick calves, penicillin was administered to all calves in the affected holding. When cases of blackleg occur, this treatment protocol can be put in place at the moment of vaccination because new cases may keep popping up due to spore activation after trauma inflicted on cattle by management during vaccination [3].

Conclusion

A delay in booster vaccination interferes with the development of immunity in early-weaned calves and can result in mortality from *C. chauvoei* infection. Treatment with penicillin and steroidal anti-inflammatory drugs in calves exhibiting early clinical stages

of the blackleg are efficient, as was penicillin administration concomitant with revaccination in healthy cattle from affected lots.

Acknowledgements

This study was partially funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001, by Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brazil, and by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul. One of the authors (Ricardo A. A. Lemos) has a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil (309074/2018-5).

Role of the funding source

The sponsor had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data.

Conflict of interest: no conflict of interests is declared.

References

1. Uzal FA, Paramidani M, Assis R, Morris W, Miyakawa MF (2003) Outbreak of clostridial myocarditis in calves. *Vet Rec* 152: 134-136.
2. Useh NM, Adamu S, Ibrahim N, Nok AJ, Esievo KAN (2010) Outbreaks of blackleg of cattle in northern Nigeria. *Slov Vet Res* 47: 39-44.
3. Groseth PK, Ersdal C, Bjelland AM, Stokstad M (2011) Large outbreak of blackleg in housed cattle. *Vet Rec* 169: 1-2.

4. Abreu CC, Uzal FA (2016) Blackleg. Clostridial histotoxic infections. In: Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Ropoff MR, editors. Clostridial diseases of animals. John Wiley & Sons, Iowa. 231-294.
5. Ziech RE, Gressler LT, Frey J, Vargas AC (2018) Blackleg in cattle: current understanding and future research needs. Cienc Rural 48: 1-10.
6. Kriek NPJ, Odendaal MW (2004) *Clostridium chauvoei* infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Infectious diseases of livestock. Oxford University Press, Southern Africa, Cape Town. . 1856-1862.
7. Araujo RF, Curci VCLM, Nobrega FLC, Ferreira RMM, Dutra IS (2010) Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. Pesq Vet Bras 30: 554-558.
8. Constable P, Hinchcliff KW, Done S, Gruenberg W (2007) Blackleg. Diseases associated with bacteria II. In: Constable P, Hinchcliff KW, Done S, Gruenberg W, editors. Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders Elsevier, Philadelphia. 828-830.
9. Abreu CC, Edwards EE, Edwards JF, Gibbons PM, Araújo JL, Rech RR, Uzal FA (2017) Blackleg in cattle: a case report of fetal infection and a literature review. J Vet Diag Invest 29: 612-621.
10. Heckler RF, Lemos RAA, Gomes DC, Dutra IS, Silva ROS, Lobato FCF, Ramos CAN, Brumatti RC (2018) Blackleg in cattle in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. Pesq Vet Bras 38: 6-14.
11. Straffuss AC (1988) Necropsy. Procedures and basic diagnostic methods for practicing veterinarians. Iowa: Springfield 244p.
12. Assis RA, Lobato FCF, Lobato ZIP, Camargos MF, Nascimento RAP, Vargas APC, Salvarani FM, Uzal FA (2008) Multiplex PCR for identification of *Clostridium*

chauvoei and *Clostridium septicum*. Arq Bras Med Vet e Zootec 60: 294-298.

[Article in Portuguese].

13. Assis RA, Lobato FCF, Serakides R, Santos RL, Dias GRC, Nascimento RAP, Abreu VLV, Parreiras PM, Uzal FA (2005) Immunohistochemical detection of Clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. Pesq Vet Bras 25: 4-8.
14. Uzal FA (2012) Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. Vet Clin Food Anim 28: 71-77.

2.3. Approaches for a field diagnosis of abamectin poisoning in calves 1

Carolina C Guizelini², Rayane C. Pupin², Tessie B. M. Möck², D.R. Morais², Juan A.C. Arredondo²,
Letícia L. Robalinho², Amanda Gimelli² and Ricardo A. A. de Lemos^{2*}

Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, aceito para publicação em 2020 e escrito conforme as normas da mesma.

ABSTRACT. Guizelini C.C., Pupin R.C., Möck T.B.M., Morais D.R., Colman J., Robalinho L.L, Gimelli A. & Lemos R.A.A. 2019. [Approaches for a field diagnosis of abamectin poisoning in calves]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0): 00-00. Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Senador Felinto Muller 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil. E-mail: ricardo.lemos@ufms.br

An approach for the diagnosis of an abamectin outbreak in calves in the field is described and discussed. In a Midwestern Brazilian property, nine out of a 52 newborn calves were affected and died, making up for morbidity, mortality, and lethality ratios of 17.3%, 17.3%, and 100%, respectively. Major clinical signs included tremors in various muscle groups, inability to stand, and difficult, wheezing breathing. Each affected calf had been treated subcutaneously with abamectin (0.4mg/kg/body weight). No lesions were found at necropsy or at histological examination. Major diseases of newborn calves were included in the differential diagnosis.

INDEX TERMS: Cattle diseases, toxic disorders, abamectin, diagnosis approach

RESUMO.- [Abordagem para um diagnóstico a campo da intoxicação por abamectina em bezerros]. Uma abordagem para o diagnóstico de um surto de abamectina em bezerros a campo é descrita e discutida. Numa propriedade do Centro-Oeste brasileiro, nove de um lote de 52 bezerros de 3 dias de idade foram afetados e morreram, perfazendo quocientes de morbidade, mortalidade e letalidade, respectivamente, de 17,3%, 17,3% e 100%. Os principais sinais clínicos incluíam tremores em vários grupos musculares, incapacidade em se manter em pé, e respiração difícil e estertorosa. Cada bezerro afetado havia sido tratado por via subcutânea com abamectina, na dose de 0,4mg/kg/peso corporal. Não foram encontradas lesões na necropsia, nem no exame histológico. As principais doenças de bezerros recém-nascidos foram incluídas no diagnóstico diferencial.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças do bovinos, distúrbios tóxicos, abamectina, abordagem diagnóstica

INTRODUCTION

Abamectin-based products are widely used, most of the times safely, as antiparasitic in cattle, but cases of poisoning occur in young calves (Seixas et al. 2006, Ferreira et al. 2011, Guerra et al. 2011). Clinical signs associated with abamectin poisoning include somnolence, ataxia, progressive paresis, mydriasis, decreased tone of tongue and lips, drooling, decubitus, and coma. The outcome is usually fatal (Seaman et al. 1987, Button et al. 1998, Seixas et al. 2006, Swor et al. 2009). As this intoxication does not cause macroscopic and microscopic changes (Button et al. 1998), the diagnosis should be supported by the history of the use of the active ingredient in calves, observation of the clinical signs and ruling out other possible causes (Seixas et al. 2006), as organophosphate poisoning (Oliveira-Filho et al. 2010, Rivero et al. 2011).

In most cases, the intoxication occurs when the drug is used to control myiasis in newborn calves, using the same dosages recommended for ivermectin or doramectin-based deworming (Riet-Correa 2007). In outbreaks of abamectin toxicity, when abamectin-based products are reportedly being used, diagnosis can be made more quickly (Button et al. 1998, Guerra et al. 2011). However, in cases of iatrogenic intoxication, when the product is misused, and yet its use is not recorded in the clinical history, the diagnosis becomes challenging and requires intense epidemiological investigation including the collection of relevant data and reviewing comprehensively the sanitary procedures adopted for calves.

The aim of the present study is to describe an outbreak of iatrogenic intoxication by abamectin in 15-day-old calves, emphasizing the importance of proper diagnostic approach in cases where administration of the drug is not included in the initial history.

MATERIAL AND METHODS

An outbreak of neurological disease in cattle in a farm (latitude 20°08'30" South and longitude 54°23'58"West) located in Midwestern Brazil was studied. Clinical signs and epidemiological data were obtained from the animal caregiver and from the veterinary practitioner who looked over for the cattle in that farm. Also, clinical examination of affected cattle was performed by staff of the Laboratory of Anatomic Pathology of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LAP-FAMEZ). Four calves were necropsied. Tissue fragments from several organs were collected in 10% buffered formalin, processed routinely for histopathology, and stained by hematoxylin and eosin (HE). Brain and spleen impressions were performed looking for blood parasites (Tyler et al. 2002). Fresh fragments from the brain were sent to bacterial culture.

RESULTS

At the time of the outbreak, there were 52 calves with weights of 25 kg at birth. The routine care with the calves was as follows: up to two days after birth the navel was treated with an antiseptic (Umbicura® - Pecuarista d'Oeste) and each calf received 1ml of a subcutaneous antiparasitic drug (Dorax® 1% - Agener).

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/FAMEZ/UFMS

Avenida Senador Filinto Muller nº 2443-Cidade Universitária - CEP: 79070-900 - Campo Grande-MS

☎ 3345-3645 ☎ 3345-3600 ✉ civet.famez@ufms.br

By the morning of first day of the outbreak, the calves' caregiver found four 3-day-old calves dead. In the next day, three additional calves of the same age were found dead, and two were sick and died within 24 hours.

Clinical signs included tremors in several muscle groups, failure to stand and challenging, noisy breathing.

Due to a tentative diagnosis of tick fever and pneumonia, affected calves were treated with 44-diazoaminodibenzamidina diacetate (Diaség® - Coopers) and oxytetracycline (Terramicina LA® - Zoetis). Calves that did not have their navel disinfected two days after birth and were still considered vulnerable of navel inflammation received prophylactic treatment with a mixture of trichlorphon (Bertac® - Eurofarm) and fention (Tiguvon® - Bayer). However, none of the calves who became sick and died was treated with neither of these two drugs.

At necropsy of three of the four necropsied calves, there were no detectable lesions. In the other one, there was subacute suppurative omphalophlebitis; the liver was swollen, with rounded edges and imprinted with rib marks on its capsular surface. No significant microscopic lesions were observed in any organ of the four necropsied calves, except for the omphalophlebitis already detected clinically. Impression smears from the brain and spleen and culture from the brain resulted negative.

Well after the efforts for investigating the cause of the disease of the calves had begun, the calves caregiver admitted that for a certain period of time, which coincided with the period that calves became sick and died, he had used abamectin at 1% (Lancer®-Valée) (1ml/calf) because the supplies of doramectin has run out.

DISCUSSION

For various reasons, finding the causes of the current outbreak was challenging and constituted an excellent field diagnostic exercise. The collected data indicated that morbidity, mortality and lethality were, respectively, 17.3%, 17.3%, and 100%. The diagnosis was initially further complicated by the lack of a history of administration of any product with abamectin to the calves, which is a fundamental criterion for establishing the diagnosis (Riet-Correa 2007).

The initial suspicion of cerebral babesiosis was predominantly based on the neurological features which were somewhat similar to cerebral babesiosis, which is commonly observed in neonatal cattle in this region (Pupin et al. 2019). However, cerebral babesiosis was ruled out due to the absence of compatible macroscopic lesions (Rodrigues et al. 2005, Antoniassi et al. 2009) and in the absence of red blood cell parasites.

Neurological disease in newborn calves can be associated with failure of passive immunity transfer due to colostrum deprivation. This can result in septicemia and suppurative leptomeningitis from an infected navel (Fecteau et al. 2009), a condition known as neonatal bacterial suppurative meningitis or NBSM (Cantile & Youssef 2016), usually produced by *Escherichia coli* or *Streptococcus* spp. (Miller & Zachary 2017). This diagnosis was also at one time considered, but then ruled out on gross, histopathological, and bacteriological grounds. Although one of the calves had

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/FAMEZ/UFMS

Avenida Senador Filinto Muller nº 2443-Cidade Universitária - CEP: 79070-900 – Campo Grande-MS

☎ 3345-3645 ☎ 3345-3600 ✉ civet.famez@ufms.br

omphalophlebitis, all four calves lacked suppurative leptomeningitis, polyarthritis, choroiditis and endophthalmitis, which are hallmarks of NBSM. Furthermore, no bacterium was cultured from the brain.

The fact that all cases occurred within a short period (three days), and that all calves born on those three days were affected, led to the suspicion of a toxic condition. The clinical picture and the absence of macroscopic and microscopic lesions (Oliveira-Filho et al. 2010, Lopes et al. 2014.) led to the suspicion of organophosphate poisoning since this type of drug was used, at some time, to disinfect the newborn calves' navels.

The toxic mechanism of organophosphate and carbamates is the inhibition of acetylcholinesterase resulting in the accumulation of acetylcholine, that maintains the stimuli on its receptors, causing hyperstimulation of the parasympathetic nervous system (Kwong 2002). Therefore, one way to make a diagnosis of organophosphate and carbamates poisoning is to measure acetylcholinesterase in red cells and its activity in the plasma (Coye et al. 1987). However, these tests are not available in most laboratories. The diagnosis is then based on the history that indicates exposure to toxic substances, neurological clinical picture, and the absence of significant macroscopic and microscopic findings in necropsied cattle (Barros et al. 2006). All of these criteria were present in this outbreak. However, a closer look at the property records revealed that none of the affected calves in the outbreak had their navel treated with trichlorfon or fention.

The ruling out of all the diseases described above led us to investigate another possible cause for the neurological disease that lacked gross and histological lesions. We decided then to investigate further the possibility of the use, not reported previously by the calves' caregiver, of abamectin, due to similarity of the clinical signs with this toxicity. It was then found that a product (Lancer®-Valée) containing 1% of abamectin had been administered (1ml/calf). If one considers the weight of calves at birth, the dose they received (0.4mg/kg/ body weight[bw]) was twice that recommended (0.2mg/kg/bw) by the manufacturer. Under experimental conditions, administration of abamectin, even at the manufacturer's recommended doses, in calves less than four months of age, was responsible for the development of clinical signs and death (Seixas et al. 2006).

Abamectin belongs to the group of avermectins, which includes ivermectin and doramectin. Abamectin usually does not cause toxic effects in adult cattle due to its high molecular weight, which prevents it from crossing the blood-brain barrier (Gerenutti & Spinosa 1997). In young calves (up to four-months-old), however, this barrier is immature and facilitate the entrance of the active principle into the central nervous system, resulting in severe intoxication characterized by neurological signs (Button et al. 1998).

The diagnostic approach adopted in this outbreak made possible to elaborate a clinical suspicion that led to the epidemiological investigation and the identification of the source of the intoxication. To reach the diagnosis we considered the set of signalment, history, clinical signs, necropsy and histopathological findings, and complementary microbiological and parasitic exams. This approach is considered to be ideal in the decision-making process to reach a definitive diagnosis (Maxie & Miller 2016). In this context, we evaluated the leading causes of death in calves with clinical

signs compatible with those observed in this outbreak and, if necessary, ruled them out for not meeting the diagnostic criteria.

CONCLUSIONS

Abamectin (0.4mg/kg/bw) prove toxic for 3-day-old calves. The toxicosis induces an acute neurological disease with no associated gross or histological changes. Clinical and epidemiological aspects are paramount for a field diagnosis with limited laboratory aid.

Acknowledgements.- One of the authors (RAAL) has a research fellowship from the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This study was partially funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul.

Conflict of interest statement.- The authors have no competing interests.

REFERENCES

- Antoniassi N.A.B., Corrêa A.M.R., Santos A.S., Pavarini S.P., Sonne L., Bandarra P.M. & Driemeier D. 2009. Cerebral babesiosis outbreak in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciênc. Rural*. 39:933-936. <doi.org/10.1590/S0103-84782009000300049>
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Intoxicação por organofosforados e carbamatos, p.130-133. In: *Ibid. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil*. Valée, Montes Claros, Brasil.
- Button C., Barton R., Honey P. & Rickford P. 1998. Avermectin toxicity in calves and an evaluation of picrotoxin as an antidote. *Aust. Vet. J.* 65(5):157-158. <doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb14448.x>
- Cantile C. & Youssef F. 2016. Nervous system: bacterial and pyogenic infections of the nervous system, p.253-365. In: Maxie M.G. (Ed), Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6th ed. Vol. 1. Elsevier, St. Louis.
- Coye M.J., Barnett P.G., Midtling J.E., Velasco A.R., Romero P., Clements C.L. & Rose T.G. 1987. Clinical confirmation of organophosphate poisoning by serial cholinesterase analyses. *Arch. Intern. Med.* 147(3):438-442. <doi.org/10.1001/archinte.1987.00370030042010>
- Fecteau G., Smith B.P. & George L.W. 2009. Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 25:195-208. <doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.004>
- Ferreira L.E.P.A., Afonso J.A.B., Dantas A.C., Silva N.A.A., Guimarães J.A., Cajueiro J.F.P., Gomes R.C. & Dantas A.F.M. 2011. Intoxicação por abamectina em bezerros no agreste meridional de Pernambuco. *Vet. e Zootec.* 18(4-3):663.
- Gerenutti M. & Spinosa H.S. 1997. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. *Biotemas.* 10(2):07-27.

- Guerra R.F.P., Carvalho G.D., Araújo L.N.R. & Serrano M.T.L. 2011. Uso inadequado de Abamectina em bezerros Girolandos: Relato de Caso. *Pubvet, Londrina*. 5(29):1-10.
- Kwong T.C. 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.* (24):144-149.
- Lopes W.D.Z., Carvalho R.S., Gracioli D.P., Oliveira P.V., Pereira V., Martinez A.C. & Mazzucatto B.C. 2014. Intoxicação aguda por triclorfon em caprinos tratados com a dose terapêutica. *Pesq. Vet. Bras.* 34(2):114-118. <doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200003>
- Maxie M.G. & Miller M.A. 2016. Introduction to the diagnostic process, p.1-15. In: Maxie M.G. (Ed) Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6th ed. Vol. 1. Elsevier, St. Louis.
- Miller A.D. & Zachary J.F. 2017. Nervous system: Septicemia, p.837-8385. In: Zachary J.F. (Ed) Pathological basis of Veterinary Disease, 6th ed. Elsevier, St. Louis.
- Oliveira-Filho J.C., Carmo P.M.S., Pierezan P., Tochetto C., Lucena R.B., Rissi D.R. & Barros C.S.L. 2010. Intoxicação por organofosforado em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30(10):803-806. <doi.org/10.1590/S0100-736X2010001000001>
- Pupin R.C., Guizelini C.C., Lemos R.A.A., Martins T.B., Borges F.A., Borges D.G.L. & Gomes D.C. 2019. Retrospective study of epidemiological, clinical and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995-2017). *Ticks Tick-Borne Dis.* 10(1):36-42. <doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.015>
- Riet-Correa F. 2007. Intoxicação por avermectinas e milbemicinas, p.52-55. In: Doenças de ruminantes e equídeos. Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), vol.2, 3ª ed, Editora Pallotti, Santa Maria.
- Rivero R., Matto C., Adrien M.L. & Rampoldi O. 2011. Intoxicação por organoclorados (endosulfan) em bovinos no Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):277-280. <doi.org/10.1590/S0100-736X2011000400001>
- Rodrigues A., Rech R.R., Barros R. R., Figuera R. A. & Barros C.S.L. 2005. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. *Ciê. Rural* 35(1):121-125. <doi.org/10.1590/S0103-84782005000100019>
- Seaman J.T., Eagleson J.S., Carrigan M.J. & Webb R.F. 1987. Avermectin B1 toxicity in a herd of Murray Grey cattle. *Aust. Vet. J.* 64(9):284-285. <doi.org/10.1111/j.1751-0813.1987.tb15963.x>
- Seixas J.N., Peixoto P.V., Armien A.G., Jabour F.F. & Brito M.F. 2006. Aspectos clínicos e patogenéticos da intoxicação por abamectina em bezerros. *Pesq. Vet. Bras.* 26(30):161-166. <doi.org/10.1590/S0100-736X2006000300006>
- Swor T.M., Whittenburg J.L. & Chaffin M.K. 2009. Ivermectin toxicosis in three adult horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235(5):558-562. <doi.org/10.2460/javma.235.5.558>
- Tyler R.D., Cowell R.L., MacAllister C.G., Morton R.J. & Caruso K.J. 2002. Introduction, p.01-18. In: Cowell R.L. & Tyler R.D. (Eds), Diagnostic cytology and hematology of the horse. 2ª ed. Mosby, St. Louis.

Anexos

A. CONDOTA DIAGNÓSTICA EM DOENÇAS DE BOVINOS DE CORTE – Guia Prático

Introdução

Um problema comum nos livros didáticos que dificulta a aplicação prática dos conhecimentos neles contidos para a realização do diagnóstico veterinário é a abordagem isolada e de forma segmentar das doenças. A abordagem didática segue tradicionalmente tópicos ordenados sobre a etiologia, epidemiologia, sinais clínicos e achados de necropsia e histopatologia de determinada doença. Esta abordagem é importante e adequada para o conhecimento das doenças, porém, em situações reais, muitas delas se confundem, dificultando o diagnóstico. Nesse contexto, este guia propõe uma abordagem através de estudo de casos selecionados a partir de situações reais, nas quais as condições epidemiológicas, sinais clínicos e até mesmo lesões comuns a mais de uma doença podem ocorrer simultaneamente. Esta abordagem tem como principal objetivo desenvolver no profissional médico veterinário o raciocínio crítico necessário para a realização de diagnósticos corretos, o que necessariamente implica sua capacidade de realizar o diagnóstico diferencial entre as várias doenças que se confundem.

No entanto, para que isto seja possível, vários conceitos precisam ser trabalhados, principalmente aqueles referentes à interpretação dos dados epidemiológicos, clínicos, patológicos e laboratoriais. Assim, o guia inicia comentando a respeito de conceitos importantes para o estabelecimento de um diagnóstico conclusivo, passando então, para a discussão de casos e a conduta diagnóstica necessária para a solução dos mesmos.

Conceitos básicos para a conduta diagnóstica em doenças de bovinos de corte

O diagnóstico veterinário baseia-se no conjunto de informações obtidas a partir do histórico, somados aos dados da anamnese, sinais clínicos, lesões macroscópicas, alterações microscópicas nos tecidos e células, e qualquer teste auxiliar (microbiológico, imunológico, molecular, toxicológico/químico, entre outros) que permita o médico veterinário chegar a uma conclusão plausível com respeito à causa da doença ou morte do animal (MAXIE, MILLER, 2016). Compreender este conceito significa entender que a realização de um diagnóstico correto é muito mais do que a simples coleta e remessa de amostras de tecidos para um laboratório de diagnóstico.

Para que tenhamos sucesso nesta tarefa, é preciso compreender que todas as etapas citadas acima são fundamentais e nenhuma pode ser negligenciada ou supervalorizada no processo devido a motivos que serão comentados posteriormente.

Inicialmente, é necessário que nosso raciocínio parta de dois pontos: de animais com manifestações clínicas de doenças ou de animais que já estão mortos. Devemos desenvolver a capacidade de, com base nos sinais clínicos e na realização de necropsias, elaborar uma relação de possíveis suspeitas e, a partir destas formular questões pertinentes sobre a epidemiologia, definir quais exames complementares devem ser realizados e como as amostras de tecidos para estes exames devem ser coletadas.

Um aspecto relevante no diagnóstico veterinário, principalmente em animais de produção, é que, na maioria das situações, a realização de um diagnóstico rápido, mesmo que presuntivo, baseado no quadro clínico e achados de necropsia, é fundamental para a adoção de medidas imediatas e para a redução dos prejuízos.

De volta aos pontos envolvidos no processo de diagnóstico, vamos agora comentar cada um deles separadamente:

Por que as caracterizações epidemiológica, clínica e anatomopatológica de um problema são importantes?

1. **Epidemiologia:** de um modo simplificado, pode-se dizer que conhecer a epidemiologia de uma doença é saber quando, como e por que ela ocorre. Assim, **todas** as informações referentes ao caso se tornam importantes e, muitas vezes, determinantes para a realização do diagnóstico. Essas informações devem ser obtidas junto às pessoas

responsáveis pelos animais e através de nossa observação acerca das condições do local e do manejo dos mesmos. Obviamente, para conseguirmos coletar informações que consideramos relevantes, precisamos saber o motivo pelo qual elas são relevantes. Antes de discutirmos cada um destes pontos, é importante deixar claro que os animais adoecem no **campo**, e não nos hospitais veterinários ou centros de diagnóstico. Assim, por mais detalhadas que sejam as informações obtidas junto ao proprietário ou funcionário das fazendas, sempre é necessária a verificação “in loco” das propriedades que possuem ocorrências de problemas sanitários.

A seguir, será comentado brevemente os principais aspectos epidemiológicos a serem investigados:

1.1. **Carcaças no pasto:** a presença de carcaças no pasto constitui um importante fator de risco para a ocorrência do botulismo, principalmente no caso de animais que não recebem suplementação mineral correta e, então, têm maior tendência a praticarem a **osteofagia**. É importante lembrar que a simples presença de carcaças ou mesmo a osteofagia **não são por si só suficientes para formular o diagnóstico de botulismo**, mas sempre são uma forte evidência epidemiológica da doença. Adicionalmente, deve-se ter atenção especial quando ocorre mortalidade por qualquer causa em uma propriedade, e as carcaças não são corretamente eliminadas; neste caso, podem ocorrer doença primária e, como consequência, o botulismo, devido às condições para a osteofagia. Isto é de particular importância quando a doença primária é a raiva, que possui sintomatologia semelhante ao botulismo e, com isso, o diagnóstico é dificultado, caso não sejam encaminhadas amostras de vários animais mortos durante o surto para a realização de exames laboratoriais. O estudo de um único animal, na maioria das vezes, inviabiliza o diagnóstico correto do problema, ou seja, a detecção da ocorrência simultânea das duas doenças.



Figura 1. Ossos espalhados em piquetes onde bovinos pastam. Este é um aspecto epidemiológico importante em doenças como o botulismo.

1.2. **Carcaças em bebedouros:** o botulismo pode ocorrer não apenas pela osteofagia; os animais também podem ingerir a toxina pela água, no chamado botulismo hídrico. Nesta forma, a presença de carcaças em fontes de água é de suma importância para a ocorrência da doença. Isto é observado com maior frequência quando animais morrem dentro de açudes e quando há mortalidades em bebedouros construídos muito próximos ao solo e em regiões alagadiças, como o Pan-

tanal. Com relação a estes bebedouros, o problema está relacionado principalmente a animais silvestres (tatus, por exemplo) que bebem água nestes e podem cair dentro, morrendo afogados. Outro cenário que contribui para a ocorrência da doença é quando as carcaças são enterradas no próprio pasto onde estão outros bovinos. Esta prática pode ocasionar, após as chuvas, acúmulos de água no local onde a carcaça foi enterrada. Considerando que a carcaça enterrada está em total condição de anaerobiose, a possibilidade de produção de grandes quantidades de toxina botulínica é muito alta, de modo que, caso esta água seja ingerida pelos bovinos, o risco de intoxicação é iminente. Além disso, as carcaças podem ser desenterradas por animais selvagens, favorecendo a ocorrência de osteofagia.

1.3. Águas paradas: os bovinos, mesmo quando têm acesso a aguadas de boa qualidade, preferem águas paradas por estas serem mais aquecidas. Também é hábito desta espécie animal defecar nas margens dos locais onde bebem água. Caso existam esporos de *Clostridium botulinum* nas fezes, os mesmos podem, nas condições de anaerobiose presentes no lodo, produzir a toxina botulínica. Esta forma de ocorrência da doença é pouco frequente, mas é importante ter conhecimento de que o botulismo pode ocorrer em animais que estão em pastos sem carcaças.

1.4. Alimentação com silagem: a alimentação com silagens de baixa qualidade é uma fonte importante nos casos de listeriose. O alimento situado na superfície ou bordas pode sofrer deterioração aeróbica pela entrada de ar (este fenômeno também pode ocorrer em silagens de boa qualidade) – principalmente quando há pouca fermentação e o pH é superior a 5,5. Deve-se salientar que casos de listeriose também podem ocorrer em animais que não consomem silagem. Por outro lado, a formação de toxina botulínica pode ocorrer em silagens quando essas são contaminadas por carcaças de aves e roedores. É importante uma conduta diagnóstica criteriosa para realizar o diagnóstico diferencial entre listeriose e botulismo, já que as duas doenças provocam sintomatologia neurológica.

1.5. Alimentação com feno: surtos de botulismo também podem ocorrer em animais alimentados com feno, principalmente quando existem carcaças de roedores ou aves no mesmo. A formação da toxina botulínica também pode ocorrer, independentemente da presença de carcaças de aves ou roedores, quando houver esporos de *C. botulinum* no feno e, então, “bolsões de anaerobiose” se formarem em determinados locais. Esta situação é particularmente importante quando o feno, durante o armazenamento, é umedecido, principalmente por ação da chuva (armazenamento inadequado). Isto ocorre porque a forragem, ao ser molhada, torna-se compacta, havendo expulsão do oxigênio desses locais e levando à formação de áreas de anaerobiose propícias à proliferação de *C. botulinum*, com conseqüente formação de toxina botulínica.

1.6. Alimentação com concentrado à base de milho: como mencionado anteriormente, o milho é um ótimo meio de cultivo para *C. botulinum*. A ocorrência de anaerobiose durante o armazenamento do milho pode levar à produção de toxina botulínica. A exemplo do que ocorre com o feno, o umedecimento do milho causa a formação de grumos, os quais eliminam o ar que havia entre os grãos, ocasionando um ambiente favorável à formação da toxina. Nessas situações, é comum que adoecem apenas os animais de um lote de confinamento, ou seja, aqueles que consumiram o alimento do local umedecido.

1.7. Suplementação mineral com composição deficiente: a deficiência de fósforo e cálcio é de grande importância em vacas que estão no período de lactação, uma vez que a exigência destes minerais é maior durante esta época e as mesmas podem desenvolver quadros de hipocalcemia e subseqüente morte. Além disso, essas deficiências são o principal fator desencadeante da osteofagia, a qual é um dos fatores que favorece a ocorrência de botulismo. É importante lembrar que a suplementação mineral adequada depende da disponibilidade de sal mineral que atenda as exigências minerais da categoria animal em questão, e isto implica no fornecimento constante de mistura mineral de boa qualidade e da metragem de cochos compatível com o número de animais existentes no local.

1.8. Região de serras, morros, cavernas, propriedades com chaminés abandonadas, túneis de ferro, etc.: estas observações são particularmente importantes na raiva, pois o morcego hematófago é o principal transmissor da raiva dos herbívoros, e estes locais são favoráveis ao estabelecimento de suas colônias.



Figura 2. Epidemiologia da raiva bovina. Cavernas são uns dos locais de predileção dos morcegos hematófagos. Cortesia: Fábio Shiroma.

1.9. Animais espoliados por morcegos: devido à importância dos morcegos hematófagos na transmissão da raiva dos herbívoros, a observação de animais espoliados (sugados) por eles é uma forte evidência da ocorrência da doença ou é um alto risco para que ela aconteça. A visualização da região espoliada é mais fácil em equinos pois, nestes animais, o morcego tem predileção pela região do pescoço e utiliza as crinas para se fixar nos mesmos; neste caso, os sinais são característicos: sangue coagulado no pescoço e tranças feitas na crina. Já nos bovinos, a espoliação geralmente ocorre nas partes baixas dos membros pélvicos, tornando difícil a sua detecção. Entretanto, é necessária a inspeção cuidadosa dos animais a fim de encontrar essas marcas. Outro fato a ser destacado é que, geralmente, os morcegos voltam ao mesmo local da primeira espoliação.

1.10. Casos ocorrendo em diferentes espécies animais: muitas doenças acometem uma única espécie animal, preferencialmente uma espécie, ou várias espécies. Esta simples observação pode, muitas vezes, ser de grande auxílio no diagnóstico visto que a ocorrência simultânea de casos com sinais clínicos neurológicos em mais de uma espécie animal na mesma propriedade é um indicativo de que o problema é causado por um agente etiológico capaz de afetar essas espécies em questão. Obviamente, doenças que ocorrem em várias espécies animais podem, em um certo momento, ocorrer apenas em uma determinada espécie, uma vez que o surgimento de casos clínicos depende de vários fatores. Tomando como exemplo a raiva, deve-se levar em consideração que uma determinada espécie animal pode estar em local favorável ao ataque de morcegos ou, ainda, que certa espécie tenha sido vacinada, enquanto outra, não.

1.11. Ocorrência de casos em diferentes faixas etárias ou em uma única faixa etária: muitas doenças afetam caracteristicamente animais de determinadas idades. Por exemplo, meningites são mais comuns em animais recém-nascidos; já o botulismo é mais frequente em animais adultos, e a raiva pode afetar tanto jovens, quanto adultos. Entretanto, nos casos de botulismo hídrico, animais jovens podem ser acometidos, assim como em surtos de raiva. No que diz respeito especificamente à raiva, em muitos surtos há uma ocorrência maior em bezerros, mesmo em situações em que o rebanho todo não foi previamente imunizado. É possível que isso ocorra devido à maior facilidade do ataque de morcegos a esta categoria animal. A deficiência de vitamina E e selênio (doença do músculo branco) é uma doença de animais jovens. Outras doenças ainda podem apresentar variações regionais, como a TPB que, no Sul do país, afeta principalmente animais adultos, enquanto em Mato Grosso do Sul ocorre o inverso.

1.12. Casos ocorrendo em um único pasto, em diferentes pastos ou também em propriedades vizinhas: esta observação também tem grande significado, pois está diretamente relacionada ao agente etiológico. Novamente citando a raiva como exemplo, é possível que os casos ocorram em diferentes locais da propriedade e em propriedades vizinhas, pois os morcegos hematófagos que transmitem a doença normalmente não se restringem a um único piquete. Já em casos de botulismo ou nas intoxicações causadas por plantas, a tendência é que os casos ocorram de maneira localizada, ou seja, no local ou locais da propriedade onde a fonte de intoxicação esteja presente. Em relação ao botulismo, a doença geralmente ocorre em um único piquete da propriedade. Sua ocorrência em mais de um local indica falhas sérias no manejo de carcaça ou na construção de bebedouros, os quais possibilitam que as fontes de toxina estejam em vários locais. Outra situação é o caso de confinamentos de bovinos alimentados principalmente à base de milho;

neste cenário, se o alimento contaminado foi distribuído para mais de um lote, animais de vários locais podem adoecer.

1.13. Queimadas ou roçadas dos pastos antes do início dos casos: esta situação geralmente está associada a intoxicações por plantas, principalmente *Vernonia* sp.

1.14. Casos somente em animais de determinadas raças: algumas doenças podem ocorrer mais em determinadas raças de animais. Um exemplo é a tristeza parasitária bovina (TPB), na qual os animais de sangue europeu têm maior probabilidade de desenvolver a doença por serem mais suscetíveis ao parasitismo por carrapatos. Com relação à TPB em Mato Grosso do Sul, a doença afeta principalmente bezerros, diferente do que ocorre na região Sul do país, onde animais adultos são os mais afetados. Entretanto, devido à criação bovina sul-mato-grossense ser predominantemente da raça Nelore e ao aumento dos cruzamentos com animais de taurinos, casos têm se tornado mais frequentes quando não se tem controle de vetores realizado de maneira correta e observando-se aspectos de estabilidade e instabilidade enzoótica dentro do estado. Além da TPB, a dermatofilose também possui a característica de, no estado de Mato Grosso do Sul, afetar predominantemente bovinos da raça Nelore.

1.15. Todos os doentes morrem ou há recuperação de animais: muitas vezes, esta observação pode fundamentar e direcionar o diagnóstico, pois as doenças têm características gerais de letalidade. Por exemplo, se está ocorrendo recuperação de animais, independentemente de tratamento, pode-se excluir a raiva, uma vez que esta apresenta 100% de letalidade. Outras doenças, como a meningoencefalite por BoHV ou o até mesmo o botulismo, apresentam letalidade elevada, mas que nem sempre é de 100%.

1.16. Resposta ao tratamento: a regressão dos sinais clínicos após realização de tratamento direcionado contra determinada enfermidade é considerada uma forma de diagnóstico (chamado terapêutico). Entretanto, é importante relacionar o número total de animais tratados que efetivamente se recuperaram, visto que em algumas doenças podem ocorrer curas espontâneas, principalmente se forem dadas ao animal condições de manutenção, como água e alimentos. Um exemplo disso é a **polioencefalomalacia**, termo patológico que tem como significado o amolecimento da substância cinzenta do encéfalo devido à necrose desta estrutura, e que pode ser causada pela deficiência de tiamina, intoxicação por chumbo ou enxofre, intoxicação por sal associada à privação de água, e pela infecção por BoHV. Quando a polioencefalomalacia é causada por deficiência de tiamina ou devido à intoxicação por enxofre, o tratamento dos animais afetados nos estágios clínicos iniciais propicia a recuperação em quase todos os casos. Diante disso, a resposta ao tratamento associada ao quadro clínico pode ser de grande valor em casos de doenças como a anteriormente citada. Entretanto, é comum em surtos a recuperação de animais que são medicados com vários produtos que contribuem pouco ou não contribuem para a recuperação do animal; a recuperação espontânea de alguns destes é interpretada erroneamente como resposta ao tratamento realizado.

1.17. Animais vacinados não estão adoecendo: a observação completa do esquema de vacinação da propriedade, bem como os tipos de vacinas utilizadas, além de sua validade, é muito importante para o diagnóstico. Vacinas eficazes (desde que realizadas de acordo com o protocolo recomendado) existem contra determinadas doenças, como por exemplo raiva e carbúnculo sintomático. Caso ocorram casos com sinais clínicos compatíveis com essas doenças apenas em animais não vacinados, que estejam submetidos às mesmas condições de criação dos não afetados, isso é um indício importante do problema.

1.18. Problema restrito a animais confinados: algumas doenças caracterizadas por sintomatologia neurológica ou muscular podem estar diretamente relacionadas ao alimento, como é o caso da intoxicação por *Senna* spp., quando suas sementes são acidentalmente misturadas à ração, intoxicação por antibióticos ionóforos e botulismo. Já a eimeriose, embora não relacionada à alimentação, é frequente em aglomerações de animais, pois estas favorecem a infecção.

1.19. Casos esporádicos ou em forma de surtos: de maneira geral, as doenças apresentam características quanto à sua forma de ocorrência nas populações animais, ou seja, se essas ocorrem em surtos ou em casos esporádicos. Geralmente, doenças transmissíveis ou tóxicas tendem a se manifestar na forma de surtos, enquanto as demais geralmente ocorrem na forma de casos isolados. Raiva, botulismo, intoxicação por *Senna* spp. ou por antibióticos ionóforos e a babesiose são exemplos de doenças que, na maioria das vezes, são observadas na forma de surtos. Já a ruptura do músculo gastrocnêmio, neoplasias e traumas quase sempre são casos isolados. Algumas doenças tendem a ocorrer na forma de casos isolados ou afetando poucos animais do lote, mas algumas vezes ocorrem como surtos com altas taxas de morbidade e letalidade; isto é possível de ser observado na polioencefalomalacia causada por deficiência de tiamina, meningoencefalite por BoHV e febre catarral maligna. Nesses casos, normalmente há um fator predisponente em comum, por exemplo transporte de animais ou outras situações de estresse. Outras doenças podem variar sua forma de ocorrência de acordo com o tipo de criação, como é o caso da cetose, a qual afeta vacas de alta

produção leiteira no início da lactação e vacas de corte prenhes no terço final da gestação que são submetidas a carência alimentar severa. Como esta última condição está associada principalmente às condições climáticas (frio, seca, etc.) e de manejo, geralmente é um problema de rebanho e ocorre na forma de surtos. Do mesmo modo, as meningites neonatais podem ocorrer de forma isolada em bezerros que nascem fracos devido a partos difíceis, ou filhos de vacas com tetos muito grandes que dificultam a ingestão do colostro. Porém, em algumas situações quando o manejo com o recém-nascido é inadequado (cura do umbigo e colostragem), grande número de animais pode ser afetado. Além disso, em condições especiais, como períodos de parição em épocas de severa escassez alimentar, ou programas de inseminação artificial que não consideram as características fenotípicas das mães, a ingestão de colostro pode ser inadequada e o problema pode ocorrer na forma de surtos.

1.20 Os casos iniciaram após a introdução de animais: em casos de doenças transmissíveis, essa observação pode auxiliar no diagnóstico. Para exemplificar, podemos citar casos da introdução de animais portadores de BoHV em rebanhos livres deste agente. Ela também pode ser útil quando animais são transferidos de uma área para outra dentro do período de incubação de uma doença. Um exemplo a ser citado é quando animais oriundos de áreas onde ocorre a raiva são removidos para áreas livres desta doença. Neste caso, podem ocorrer casos de raiva apenas nestes animais, pois não há transmissão de bovino para bovino.

1.21 Os casos diminuem ou cessam após a retirada dos animais do local: isto é característico de quadros de intoxicações, incluindo o botulismo, e é explicado pelo fato de que, se os animais são retirados do local onde se encontra a toxina, seja bacteriana ou de alguma planta, os casos devem cessar à medida que se esgota o tempo máximo da ação do mesmo.

1.22 Os casos cessam após chuvas: em algumas situações, a ocorrência de chuvas pode contribuir para a diminuição espontânea dos casos clínicos. Isto é observado na intoxicação por *Vernonia* sp., pois a planta perde a toxicidade à medida que se desenvolve. A ocorrência de chuvas, de modo geral, pode influenciar outras causas de intoxicação, pois na maioria dos casos, a escassez alimentar em função da seca é que leva os animais a ingerirem plantas que, em condições normais, não seriam pastejadas. Por outro lado, em casos de botulismo hídrico, a chuva pode contribuir para a diminuição dos casos por “diluir” a toxina em um volume maior de água. Desse modo, para um bovino adoecer, precisa ingerir uma quantidade muito maior de água contendo a toxina do que precisaria caso não houvesse chovido.

1.23 Os casos iniciam após chuvas: a ocorrência de chuvas pode estar relacionada ao aparecimento de algumas doenças, como é o caso do botulismo hídrico em locais onde existem carcaças enterradas, favorecendo a formação de poças d’água contendo a toxina, e da intoxicação por ureia quando a mesma é adicionada juntamente com sal mineralizado em cochos descobertos. As chuvas, associadas a quedas bruscas de temperatura, também favorecem a ocorrência de hipotermia, ocasionando a morte de muitos animais em um curto período de tempo; também favorecem o crescimento das pastagens, tornando os bovinos mais suscetíveis a pequenas abrasões na pele e permitindo, então, a ocorrência de casos de dermatofilose.

1.24 Época do ano em que ocorrem os casos: isto é particularmente importante em intoxicações por plantas e na dermatofilose, pois as condições para ocorrência da intoxicação estão diretamente relacionadas a determinadas condições, especialmente climáticas, as quais variam de acordo com as estações e os meses do ano. Existem doenças que tendem a ocorrer em certos períodos do ano, mas não estão relacionadas à época do mesmo em si, e sim à coincidência com determinados estágios fisiológicos do animal, como por exemplo a gestação e a parição, as quais se concentram em determinados meses.

1.25 Os casos cessam imediatamente após a vacinação dos animais: esta observação deve ser interpretada com cautela, e na maioria das vezes não tem qualquer significado prático. Primeiramente, deve-se considerar que, de maneira geral, as doenças possuem uma curva de distribuição de casos em que há um aumento seguido por uma diminuição, até a parada do aparecimento de casos por determinado período de tempo, podendo voltar a ocorrer novamente quando se estabelecerem condições propícias para isso. Por outro lado, para que ocorra o efeito protetor das vacinas, é preciso tempo necessário para o desenvolvimento da resposta imune, a qual leva em média 12 dias. Assim sendo, se os casos cessam imediatamente após a vacinação, é provável que isso se deva mais à tendência natural da doença do que a um efeito benéfico vacinal, mesmo que a vacina utilizada confira efeito protetor contra a doença em questão. Também devem ser avaliados outros parâmetros que podem ter contribuído para a diminuição dos casos, como medidas de manejo, correção da alimentação e suplementação, retirada dos animais do local, eliminação de carcaças, entre outros.

1.26 Casos que ocorrem após vacinações ou aplicações de medicamentos: surtos de tétano já foram diagnosticados após a realização de vacinações ou tratamento de animais devido a infecções e produção de toxina no local da injeção. Casos de intoxicações medicamentosas também podem ser observadas,

especialmente com a aplicação de abamectina. A aplicação desse princípio ativo requer cuidados, principalmente com o ajuste da dose com o peso do animal. Em condições de campo, é comum o ajuste da seringa em determinada dose do medicamento e, assim, animais com diferentes pesos recebem a mesma quantidade do produto, aumentando o risco de intoxicação. Alguns surtos de intoxicação por abamectina em bezerros foram observados após a aplicação do princípio em animais que haviam recebido brincos para identificação, e que foram tratados para evitar miíase.

1.27 Presença de carrapatos: esta observação é importante para o diagnóstico da tristeza parasitária bovina, uma vez que o carrapato atua como vetor de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp.

1.28 Aplicação de medicamentos ao nascimento: é uma prática comum que tem como objetivo a prevenção de miíases, embora possua resultados econômicos questionáveis. Certos produtos, como a abamectina, são tóxicos para bezerros recém-nascidos e podem causar a morte dos mesmos.

1.29 Realização da desinfecção do umbigo: a não desinfecção do umbigo ou a desinfecção incorreta logo após o nascimento do bezerro propicia condições para infecções do cordão umbilical, as quais podem causar o desenvolvimento de abscessos cerebrais e vertebrais, com compressão da medula espinhal. É importante lembrar que a desinfecção implica na utilização de produtos bactericidas, e não apenas na utilização de endectocidas, os quais previnem apenas as miíases, pois o fato de um bezerro não ter miíase não significa que não tenha infecção umbilical.

1.30 Casos ocorrendo em animais recém-nascidos: a ocorrência de casos em animais logo após o nascimento está relacionada a malformações congênitas ou a infecções neonatais. Os problemas congênitos podem ser hereditários ou adquiridos. Neste caso, incluem-se infecções virais da vaca prenhe (diarreia viral bovina e língua azul), ingestão de plantas teratogênicas ou aplicação de medicamentos que causem malformações. Portanto, quando se investiga mortalidade pós-natal, não se deve esquecer de doenças reprodutivas. Outros aspectos também devem ser observados, como vacas com tetos grandes, dificultando a ingestão de colostro, bezerros filhos de vacas primíparas, as quais podem ter pouca habilidade materna, e a condição da pastagem, pois em casos de escassez alimentar a produção de colostro pela vaca pode ser insuficiente.

1.31 Os casos coincidem com carência alimentar severa: uma situação relacionada à carência alimentar severa já foi abordada em questões anteriores. Outro exemplo é a ocorrência da cetose em vacas de corte, a qual está associada a deficiência alimentar no terço final de gestação. Problemas com plantas tóxicas também estão relacionados, muitas vezes, com carência alimentar, fazendo com que os animais ingiram plantas pouco palatáveis que, em condições normais, não seriam ingeridas.

1.32 Casos ocorrendo após castrações ou descornas: esta observação é particularmente importante no tétano, mas não se deve esquecer que é frequente a utilização de endectocidas, dentre os quais a abamectina, para a prevenção de miíases; além destes, meningites bacterianas podem ocorrer após descornas, com consequente manifestação de sinais clínicos neurológicos nos animais afetados.

1.33 Casos ocorrendo somente em vacas prenhes: esta característica é especialmente importante na cetose de vacas de corte, hipocalcemia pós-parto e em doenças como o botulismo associado à carência de fósforo, que podem ser vistas com maior frequência nesta categoria animal devido às maiores necessidades fisiológicas de cálcio e fósforo.

1.34 Aguadas em açude: surtos de eimeriose em animais de campo geralmente estão associados a oocistos que são depositados na água através das fezes de animais parasitados.

2. Sinais clínicos

2.1. Evolução: a maioria das doenças apresenta um período médio de evolução, e muitas vezes podemos direcionar nossas suspeitas baseando-se nesta informação. No exemplo da raiva, esta possui evolução média de três a cinco dias, embora em alguns casos a morte ocorra com dois dias e, em outros, com 10. Já no botulismo, a evolução varia de acordo com a quantidade de toxina ingerida, e a morte pode ocorrer desde poucas horas após o aparecimento dos sinais clínicos até vários dias ou semanas; em algumas situações, os animais podem se recuperar. De forma semelhante, a otite parasitária e a listeriose provocam sinais clínicos similares, mas a evolução da primeira é mais longa do que a da segunda, embora em alguns casos de listeriose, a evolução possa chegar a duas semanas. Situação semelhante pode ocorrer com todas as causas não infecciosas de polioencefalomalacia e a encefalite por BoHV, pois na última, casos com evolução prolongada às vezes são observados, enquanto na primeira, geralmente, a evolução é de poucos dias. Existem doenças que caracteristicamente têm evolução prolongada e são acompanhadas por sinais clínicos progressivos, como as neoplasias e os abscessos cerebrais e medulares.

2.2. Paralisia flácida: embora este sinal seja característico do botulismo, na prática é difícil ser diferenciado da raiva. O mesmo ocorre com a paralisia da cauda e flacidez da língua, que podem estar presentes nas duas doenças.

2.3. Rigidez muscular: é a característica mais importante no tétano e que determina a posição ereta das orelhas, a cauda arqueada e inflexível, o trismo mandibular e a chamada “posição de cavalete” do animal, que se posiciona com os membros abertos e constantemente distendidos, oferecendo muita resistência à flexão. Deve-se frisar que esses animais apresentam acentuada hiperexcitabilidade e os sinais clínicos podem ser agravados por estímulos sonoros.

2.4. Respiração acelerada ou lenta (abdominal bifásica): doenças que afetam os músculos intercostais e o diafragma podem interferir na frequência dos movimentos respiratórios. Como exemplo, podem ser citados o tétano, no qual a respiração é acelerada, e o botulismo, em que a respiração tende a ser lenta, abdominal e bifásica, caracterizada por um movimento inspiratório curto e outro expiratório longo. Estes sinais estão relacionados à evolução do quadro clínico.

2.5. Opistótono: observado com frequência na polioencefalomalacia, meningoencefalite por BoHV e, menos comumente, na raiva. Também é observado no tétano, neste caso como consequência da rigidez muscular. Uma situação frequentemente confundida com opistótono é a posição inclinada da cabeça que bovinos com botulismo assumem muitas vezes durante o decúbito lateral, visando facilitar a respiração. Neste caso, se a posição do animal é modificada, o pescoço tende a voltar ao posicionamento normal ou não permanecer na posição de opistótono. Já no opistótono verdadeiro, isto não ocorre.



Figura 3. Polioencefalomalacia causada por deficiência de tiamina. Opistótono verdadeiro.

2.6. Cegueira: é um sinal clínico comumente relatado na polioencefalomalacia e na meningoencefalite por BoHV. Em condições de campo, o problema geralmente é percebido por tratadores dos animais e proprietários pelo fato do animal chocar-se contra obstáculos, como cercas e árvores. Dependendo da localização, abscessos ou neoplasias cerebrais também podem causar cegueira.

2.7. Diminuição do tônus ou protrusão da língua: este sinal clínico isoladamente não é específico de nenhuma doença, uma vez que pode estar presente na polioencefalomalacia, em abscessos cerebrais, na meningoencefalite por BoHV e em outras doenças que afetam determinadas regiões do SNC ou a musculatura da língua, como deficiência de vitamina E e selênio, raiva, listeriose e botulismo.



Figura 4. Botulismo alimentar em bovinos confinados. Diminuição do tônus muscular da língua.

2.8. Andar a esmo ou em círculos: essas alterações estão relacionadas a lesões no telencéfalo ou tronco encefálico e são observadas com frequência na polioencefalomalacia, na encefalite por BoHV e na listeriose. Se possível, deve-se observar se o animal realiza os movimentos circulares sempre para o mesmo lado, pois nesse caso, esta orientação pode auxiliar na localização da lesão.

2.9. Perda da sensibilidade: embora a perda da sensibilidade seja um sinal importante em muitas doenças com sintomatologia neurológica, na prática, sua avaliação pode ser difícil, pois os animais em decúbito prolongado têm diminuição da sensibilidade, principalmente nos membros pélvicos, devido à falta de irrigação sanguínea.

2.10. Decúbito esternal/esternoabdominal: este é frequente nas doenças com sintomatologia neurológica à medida que o quadro clínico evolui. Entretanto, em algumas doenças, como é o caso do botulismo, o animal consegue permanecer por si só nesta posição ou manter-se nela quando colocado, enquanto que em outras situações, principalmente quando há lesões no SNC, como na polioencefalomalacia e na meningoencefalite por BoHV, o animal, mesmo quando colocado em decúbito esternal, não consegue se manter desta maneira. Deve-se considerar que, à medida que o quadro evolui, os animais tendem ao decúbito lateral, que também tem importância limitada para o direcionamento do diagnóstico.

2.10.1. Animais permanecem deitados em decúbito esternal: se os animais conseguem permanecer neste decúbito e apresentam função psíquica normal (não têm alterações da visão percepção do ambiente, etc...), isso evidencia que não há lesão do telencéfalo, nem cerebelo, indicando um problema localizado no sistema nervoso periférico ou musculoesquelético. Isto pode ser observado no botulismo, apesar de que, nos estágios iniciais, é frequente que o animal tente levantar sem êxito ou com dificuldade. O decúbito esternal prolongado também pode ser observado na intoxicação por *Senna* spp. e por antibióticos ionóforos. Por outro lado, na raiva, o animal pode apresentar postura semelhante, embora em um exame clínico cuidadoso possam ser observadas alterações mentais, perda do reflexo anal e, geralmente, quando o animal tenta levantar ou se locomover, arrasta os membros posteriores.

2.11. Diarreia, tenesmo: a diarreia (não associada à presença de sangue) e/ou tenesmo é frequente na intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos, como *Crotalaria* sp., *Senecio* sp., *Stryphnodendron* sp., e *Enterolobium* sp., e observada em doenças como hemoncose, colibacilose, entre outras.

2.12. Protrusão anal: este sinal clínico é observado na raiva e, quando está associado a outros sinais clínicos, é uma evidência importante para o diagnóstico clínico. A protrusão anal também pode ocorrer secundariamente ao tenesmo.

2.13. Agressividade: este é um sinal clínico de difícil interpretação, pois muitas vezes, embora o animal não esteja realmente agressivo em consequência da lesão no sistema nervoso central (SNC), este manifesta agressividade em função da incapacidade de se deslocar e afastar-se das pessoas, atitude esperada em bovinos que assumem o decúbito e sentem-se ameaçados.

2.14. Animal alheio ao ambiente: a falta de relação com o ambiente é indicativo de lesão no telencéfalo ou tronco encefálico, o que exclui doenças que afetam apenas o sistema nervoso periférico (SNP) ou musculoesquelético, como o botulismo, intoxicação por antibióticos ionóforos e por *Senna* spp., ou ainda abscessos e traumatismos medulares.

2.15. Elevação da temperatura corporal (hipertermia): pode estar presente principalmente nas fases iniciais de várias doenças caracterizadas por sintomatologia neurológica e de origem infecciosa. Um caso específico em que a mesma pode auxiliar no diagnóstico diferencial é na polioencefalomalacia, na qual não há elevação da temperatura, ao contrário do que é observado na meningoencefalite por BoHV (no início do quadro clínico).

2.16. Mucosas pálidas: este sinal pode evidenciar **anemia**, a qual ocorre na TPB ou hemoncose. Em casos de babesiose, a anemia geralmente está associada a hemoglobinúria, que deixa a urina escurecida (cor de coca-cola). Na intoxicação por *Senna* spp. e pelos antibióticos ionóforos, a urina também pode estar de coloração semelhante devido à mioglobínúria.

2.17. Sialorreia (salivação excessiva): sinal clínico de várias doenças que afetam a inervação ou a musculatura da língua. É observado na raiva, polioencefalomalacia, meningoencefalite por BoHV, botulismo, doenças obstrutivas do trato alimentar superior (carcinomas de células escamosas na base da língua decorrente da intoxicação por *Pteridium aquilinum*), otite parasitária, e déficits dos nervos cranianos que ocorrem no empiema basilar e na listeriose.

2.18. Ranger de dentes (bruxismo), movimento involuntário dos olhos de um lado para o outro (nistagmo) e estrabismo (os olhos não olham exatamente na mesma direção ao mesmo tempo): são vistos com muita frequência na polioencefalomalacia, na meningoencefalite por BoHV e em alguns casos de abscessos cerebrais. Na raiva, é comum a ocorrência de bruxismo, embora nistagmo e estrabismo quase não sejam observados.

2.19. Opacidade de córnea: é uma característica importante na febre catarral maligna, enquanto o hipópico (acúmulo de pus na câmara anterior do globo ocular) pode estar presente em outras doenças, como nas meningites bacterianas e listeriose. Ulceração da córnea decorrente da ceratoconjuntivite em bezerras causada por *Moraxella bovis* e secundária a traumatismos podem também resultar em opacidade corneal.

2.20. Erosões na boca e no focinho recobertas por fibrina: também podem estar presentes na vulva, vagina, pênis e prepúcio. Essas lesões, quando observadas no exame clínico, não estão relacionadas a distúrbios neurológicos. Entretanto, elas são muito importantes quando associadas a estes, pois são fortemente sugestivas de febre catarral maligna, a qual também causa meningoencefalite.

2.21. Midríase, miose: estes sinais indicam lesões no telencéfalo ou tronco encefálico, e até em nervos ou gânglios que afetam o olho, não estando presentes na maioria das doenças que afetam o SNP. A **anisocoria** é considerada fortemente sugestiva de raiva.

2.22. Paralisia unilateral de pálpebra, orelha, lábio, língua e queda da mandíbula: as doenças mais frequentemente associadas a estes sinais clínicos são a listeriose e otite parasitária, mas todos estes podem ser também observados em qualquer enfermidade que afete os pares de nervos cranianos.

2.23. Dificuldade de locomoção, incoordenação, andar cambaleante: esses sinais clínicos, embora sempre devam ser registrados, **têm pouca importância no diagnóstico**, pois são comuns à maioria das doenças caracterizadas por desencadarem sintomatologia neurológica e em doenças musculares.

2.24. Perda progressiva da sensibilidade, com evolução prolongada: a perda progressiva da sensibilidade ocorre em muitos distúrbios neurológicos, mas, quando a evolução é prolongada, geralmente está relacionada a abscessos ou neoplasias, principalmente comprimindo a medula espinhal.

2.25. Animal separado do lote: o fato de um animal estar separado do lote pode ser causado tanto por ele estar apresentando alterações comportamentais (alheio ao ambiente) ou por simplesmente não poder se locomover juntamente com os demais. Portanto, este sinal clínico possui **pouco valor no direcionamento do diagnóstico**.

2.26. Anorexia, adipsia: estes sinais clínicos são de difícil avaliação prática pois, muitas vezes, embora o animal apresente apetite ou sede, ele não ingere água ou alimento por nervosismo, uma vez que os animais criados extensivamente possuem certa agressividade natural quando estão em contato com pessoas.

2.27. Fezes ressecadas com muco e sangue: este sinal é pouco importante, pois qualquer animal que adota a posição de decúbito no campo tem dificuldade para se alimentar e beber água, apresentando tendência ao ressecamento e estase fecal. Uma vez ressecadas, as fezes podem causar ferimentos à mucosa. Esta situação é observada com bastante frequência em casos de raiva e de botulismo. Diferentemente, a ocorrência de diarreia com sangue é um sinal clínico importante, pois pode ser sugestivo de eimeriose.

2.28. Animal em decúbito esternal, com a cabeça voltada para o flanco: esta atitude pode ser observada nos estágios finais de vários distúrbios neurológicos ou neuromusculares e possui **pouca importância para o diagnóstico clínico**, a não ser no caso de vacas leiteiras com hipocalcemia pós-parto.

2.29. Animal em decúbito esternal, apoiando o queixo sobre o solo: em muitos casos de botulismo, devido à falta de tônus muscular, o animal pode, durante o decúbito esternal, adotar esta posição. Entretanto, este sinal, sozinho, **não deve ser considerado importante para o diagnóstico**.

2.30. Jarrete permanentemente flexionado: uni ou bilateral, este sinal clínico é comumente observado nas rupturas de músculo gastrocnêmio.

Uma falha que frequentemente ocorre é pensar que a relevância dessas informações é variável de acordo com a suspeita inicial de determinada doença. Este procedimento pode conduzir o médico veterinário a direcionar a investigação para que este chegue a uma lista de diagnósticos diferenciais. Portanto, independente de qual ou quais são as suspeitas, deve-se colher **o máximo de informações possíveis** e, após a obtenção do conjunto de informações (epidemiologia, quadro clínico, lesões macro e microscópicas e exames laboratoriais complementares) buscar pelo estabelecimento do diagnóstico definitivo a fim de serem tomadas as adequadas medidas de prevenção e/ou controle.

Um ponto a ser ressaltado é que, ao contrário do que muitos pensam, a realização de um diagnóstico não é o objetivo final, mas sim o início da atuação do médico veterinário. A finalidade dos produtores quando procuram os serviços de diagnóstico não é apenas saber de qual causa seus animais estão morrendo, mas principalmente buscar saber por que eles estão adoecendo e o que o mesmo deve fazer para controlar este problema e evitar que novos casos ocorram no futuro. Isso só é possível com o conhecimento da epidemiologia das doenças.

Em relação aos sinais clínicos, pode-se ainda raciocinar de modo distinto: vários sinais clínicos são comuns a diferentes doenças, de modo que é essencial agrupá-las em síndromes clínicas. Conceitualmente, estas síndromes são um conjunto de sinais clínicos que definem a apresentação de uma ou várias doenças ou condições clínicas, independente da etiologia que as diferencia. Esta forma de abordagem facilita o diagnóstico, pois restringe as suspeitas iniciais a um grupo de doenças que provocam sinais compatíveis com os apresentados pelos animais; a partir destas, é possível buscar informações complementares que possibilitem o diagnóstico conclusivo.

Embora, assim como na epidemiologia, todos os sinais clínicos sejam importantes, quando se pensa no diagnóstico alguns destes têm um peso maior, pois ocorrem em um número restrito de doenças. Exemplificando, a hipertermia é um sinal clínico importante, assim como a incoordenação motora, porém ambas ocorrem em várias doenças. Por outro lado, a icterícia ou a cegueira ocorrem em um número restrito de doenças e, portanto, têm uma contribuição maior para o diagnóstico. Não se pode esquecer que, para a compreensão dos sinais clínicos e da sua importância, é necessário que se conheça a

patogenia das doenças para, assim, entender os mecanismos das lesões e, então, a origem dos sinais clínicos. Tomando como exemplo a icterícia, esta pode ser originada da hemólise, obstrução de ductos biliares ou de lesões hepáticas. Conhecendo a origem deste sinal clínico, é possível associá-lo a outros que estão ocorrendo concomitantemente no animal, de acordo com a origem do problema e, assim, restringir as suspeitas a doenças que apresentam ambos os sinais ao mesmo tempo. Exemplificando, em um bovino com icterícia e hemoglobinúria, as suspeitas ficarão restritas a doenças hemolíticas; em contrapartida, um bovino que apresente icterícia e lesões de pele (fotodermatite), as suspeitas serão restritas a causas de fotossensibilização hepatógena.

Considerando que os sinais clínicos são próprios de cada doença ou síndrome, aspectos referentes aos mesmos serão discutidos juntamente com os casos clínicos que serão abordados no Capítulo III. O mesmo procedimento será utilizado para os achados de necropsia e histopatológicos, e exames laboratoriais complementares.

CAPÍTULO I

Como utilizar este guia

Devemos considerar que um diagnóstico conclusivo só é estabelecido quando todas as condições referentes a uma doença (epidemiologia, quadro clínico-patológico e confirmação laboratorial) são atendidas. Assim, a conduta diagnóstica a ser adotada em situações reais é **sempre** a mesma; o que varia são os dados obtidos e a interpretação dos mesmos. Dessa forma, podemos estabelecer um protocolo que sempre será seguido e, de acordo com os dados obtidos e o cruzamento destas informações, o diagnóstico vai sendo formado. Devemos imaginar que o diagnóstico é uma via de mão dupla, onde partimos inicialmente de um número amplo de possibilidades (nossas suspeitas) e vamos reduzindo este número quando condições necessárias para determinada doença vão sendo excluídas. Então, chegamos a um diagnóstico conclusivo quando uma suspeita atende todos os critérios considerados suficientes para o diagnóstico, e todas as outras possíveis suspeitas são excluídas por não atenderem todos estes critérios.

Obviamente que, em muitas situações, mesmo adotando todos os cuidados necessários para a elaboração do diagnóstico, não conseguimos chegar a um diagnóstico conclusivo. Muitas vezes reunimos informações suficientes para termos evidências de uma determinada doença e para excluirmos outras suspeitas, mas não atendemos todos os critérios necessários. Nesses casos, temos um **diagnóstico sugestivo**, o qual, embora não seja o ideal, pode ser suficiente para orientar a tomada de decisões no controle de doenças.

Para exemplificar o que falamos acima e para facilitar a compreensão sobre como este guia deve ser usado, vamos utilizar uma situação hipotética de um surto de mortalidade de bovinos e, a partir da queixa do proprietário, vamos preencher todas as lacunas referentes às possíveis suspeitas até chegarmos ao diagnóstico final.

Tabela 1. Situação hipotética de mortalidade de bovinos para o entendimento de como utilizar este guia.

Epidemiologia	<ul style="list-style-type: none"> • Morte de bezerros e vacas; • Casos em diferentes pastos; • Presença de carcaças nos pastos; • Suplementação mineral deficiente; • Animais vacinados contra raiva: uma dose, sem a realização de reforço; • Não vacinados contra botulismo; • Vacinados contra “clostridioses” com dose e reforço + revacinação anual; • Evidências de espoliação por morcegos hematófagos nos equinos;
----------------------	---

	•	Pasto degradado, com intensa invasão por <i>S. occidentalis</i>	
Sinais clínicos	○	Incoordenação motora, com evolução para decúbito;	
	○	Paralisia da cauda;	
	○	Ausência de reflexo anal;	
	○	Diminuição da sensibilidade	
Achados de necropsia	▪	Bexiga repleta;	
	▪	Hiperemia das meninges do encéfalo	
Histopatologia	▪	Meningoencefalite e mielite não supurativas, predominantemente no tronco encefálico, GRH e medula espinhal, com corpúsculos de inclusão eosinofílico no citoplasma de neurônios	
Exames laboratoriais complementares	❖	Imunofluorescência direta positiva para raiva;	
	❖	Inoculação intracerebral em camundongos positiva	
Diagnóstico conclusivo			Raiva

Apesar de ser um exemplo bastante simples, o objetivo aqui é mostrar que, em muitas ocasiões, podemos ter condições epidemiológicas comuns a várias doenças em um mesmo surto. O mesmo pode acontecer com os sinais clínicos, achados de necropsia e até mesmo com a histopatologia. No entanto, quando analisamos o conjunto dos dados, observamos que muitos deles, embora importantes do ponto de vista sanitário, não têm relação com a causa das mortes naquele momento. Essa capacidade de coletar todas as informações relevantes para a elucidação de um caso que inclui, desde a abordagem epidemiológica, caracterização do quadro clínico e patológico (o qual envolve a interpretação correta de sinais clínicos e achados de necropsia), até a coleta e acondicionamento das amostras de tecidos para exames laboratoriais de forma adequada, e a interpretação dos resultados destes exames. Esses pontos é que discutiremos no capítulo seguinte.

CAPÍTULO II

Caso clínico 1. Raiva

O proprietário de uma fazenda no município de Rio Negro solicitou atendimento veterinário para um bezerro de quatro meses de idade, mestiço que há dois dias começou a apresentar incoordenação motora e evolução para decúbito esternoabdominal. Este bezerro, filho de vaca leiteira, permanecia em piquetes próximos à sede da propriedade. O proprietário informou que outro bezerro, também filho de vaca leiteira, e uma novilha Nelore de dois anos de idade, que ficava em um outro piquete daquela mesma fazenda, apresentavam sinais clínicos semelhantes e morreram após cinco e sete dias do início dos sinais clínicos. Durante a visita do médico veterinário, foram observados dois bezerros do mesmo lote, uma fêmea mestiça com idade de oito meses, um macho Brangus de três meses de idade e outra novilha Nelore de dois anos, todos também com sinais clínicos neurológicos. Estes animais apresentavam, com intensidades variadas, incapacidade de ficar em estação devido à incoordenação dos membros pélvicos, flacidez de língua, diminuição da sensibilidade dos membros torácicos e pélvicos, ausência de reflexo anal e paralisia de cauda. Entretanto, apesar destes sinais, mantinham-se em alerta, com estado mental sem alterações aparentes.

Durante a inspeção da propriedade, observou-se que os pastos eram limpos, abundantes e sem plantas invasoras, porém nos arredores destes e em curvas de níveis, havia grande quantidade de *Senna occidentalis*, popularmente conhecida como fedegoso. Também foram vistos alguns cavalos e bezerros espoliados por morcegos, e alguns barracões abandonados com o solo sujo contendo fezes de morcegos.



Figura 5. Epidemiologia da raiva bovina. Galpão abandonado, escuro e repleto de árvores ao redor, sendo potencialmente um abrigo de morcegos.



Figura 6. Epidemiologia da raiva bovina. Região caudal da quartela apresentando área de espoliação por morcegos.

O fornecimento de mistura mineral era adequado, assim como a metragem do cocho, e a mistura era formulada de acordo com a categoria animal. As carcaças eram encaminhadas a um “cemitério” cercado com arame para posteriormente serem queimadas; porém, havia numerosos ossos na pastagem onde os bovinos ficavam. Estes animais eram vacinados contra botulismo (uma dose aos 24 meses, com reforço após 30 dias e revacinação anual) e “clostridioses” (uma dose aos quatro meses, reforço na desmama e revacinação anual), e não eram vacinados contra raiva. A vacinação contra febre aftosa seguia o calendário oficial. Em todos os piquetes, os bovinos consumiam água de bebedouros de cimento, as quais estavam limpas e em boas condições. As paredes dos bebedouros de cimento eram elevadas e permitiam o acesso dos bovinos, mas dificultavam o acesso de animais selvagens. Os bezerros, logo após o nascimento, tinham o umbigo desinfectado com solução de iodo diluída a 2,25% e recebiam uma dose de vermífugo à base de doramectina via intramuscular.



Figura 7. Sinal clínico de raiva. Bovino em decúbito esternal e alerta aos estímulos do ambiente.

Neste ponto, vamos fazer uma pausa e comentar sobre a diferença entre uma abordagem diagnóstica puramente clínica e patológica e uma abordagem com o conceito de diagnóstico utilizada no início deste guia. Poderíamos simplesmente proceder os exames clínicos dos bovinos doentes, realizar necropsias e enviar material para exames laboratoriais de acordo com a nossa suspeita, e aguardar os resultados. Esta conduta pode nos levar a um diagnóstico conclusivo, caso a doença em questão apresente lesões características na histopatologia e resultados conclusivos nos exames laboratoriais. Porém, devemos considerar que, na maioria das situações, este é o único momento que temos para realizar a coleta de amostras de tecidos e, então, se deixarmos de examinar e colher algo importante caso nossa suspeita inicial esteja incorreta, não teremos oportunidade de corrigir esta falha. Por outro lado, se elaborarmos uma relação de possíveis causas, com base em uma abordagem que, além da clínica e patologia, envolve a epidemiologia, podemos coletar amostras para o diagnóstico de todas as nossas suspeitas e, em um momento seguinte, decidir quais exames deverão ser realizados.

Voltando ao presente caso, se considerarmos apenas os casos clínicos iniciais, poderíamos conduzir nossas suspeitas para doenças do sistema nervoso de bezerros que incluem, além da raiva, quadros de septicemia como salmonelose, babesiose cerebral e intoxicações por produtos químicos (organofosforados e abamectina, por exemplo). Por outro lado, se considerarmos apenas os bovinos adultos, poderíamos incluir em nossas suspeitas – novamente, além da raiva - o botulismo e a intoxicação por *S. occidentalis*, a qual, embora não provoque lesões no sistema nervoso central, causa lesões musculares que podem ser confundidas com quadros clínicos neurológicos. Desta forma, se

analisarmos separadamente adultos e bezerros, teríamos quatro suspeitas para os primeiros e três para os segundos, sendo apenas uma (raiva) comum aos dois. Assim, somadas as suspeitas, teríamos uma lista inicial com sete doenças. Porém, quando fazemos a avaliação conjunta dos dados clínicos e epidemiológicos, percebemos que nossas suspeitas podem ser reduzidas, pois algumas destas não atendem todos os critérios para o diagnóstico conclusivo. O fato de casos ocorrerem em bovinos de diferentes idades praticamente exclui, salvo nos casos de babesiose cerebral, doenças como salmonelose, botulismo e intoxicação por *Senna* spp. Por sua vez, a raiva atende todas essas condições e passa, assim, a ser nossa principal suspeita. Além disso, várias outras características desta doença estão presentes neste caso, como evidências de espoliação de morcegos hematófagos, ocorrência de casos em diferentes pastos e a ausência de vacinação no rebanho.

Aqui, já é possível perceber que nossa conduta, além de fornecer-nos uma suspeita bem fundamentada, também indica os pontos críticos no manejo sanitário, os quais devem ser corrigidos. O próximo passo é a realização de necropsias e a coleta de amostras de tecidos para exames laboratoriais. Um aspecto fundamental para o diagnóstico correto é que, por mais evidências que tenhamos de que uma de nossas suspeitas iniciais está correta, **em nenhuma fase do processo de diagnóstico podemos excluir totalmente a possibilidade de estarmos errados**. Assim, mesmo com todas as evidências de que estamos frente a um caso de raiva, devemos realizar a necropsia completa, examinando e coletando **todos os órgãos**, a fim de descartar os diagnósticos diferenciais e confirmar a suspeita principal.

Então, devemos procurar por possíveis alterações que ocorrem na raiva, como bexiga repleta, reto distendido por fezes ressecadas, hiperemia das meninges do sistema nervoso central e pneumonia aspirativa; todas estas contribuem para reforçar a suspeita diagnóstica. Porém, devemos lembrar que **a ausência destas lesões não exclui a suspeita de raiva**.

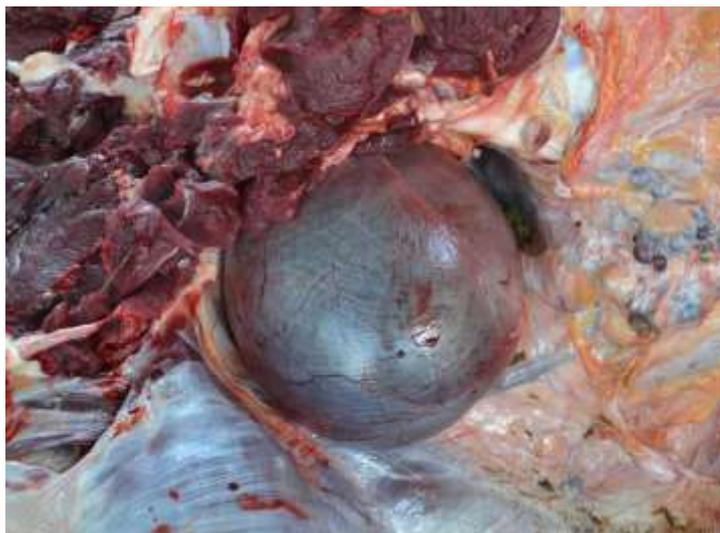


Figura 8. Achados macroscópicos da raiva bovina. Bexiga acentuadamente repleta por urina.

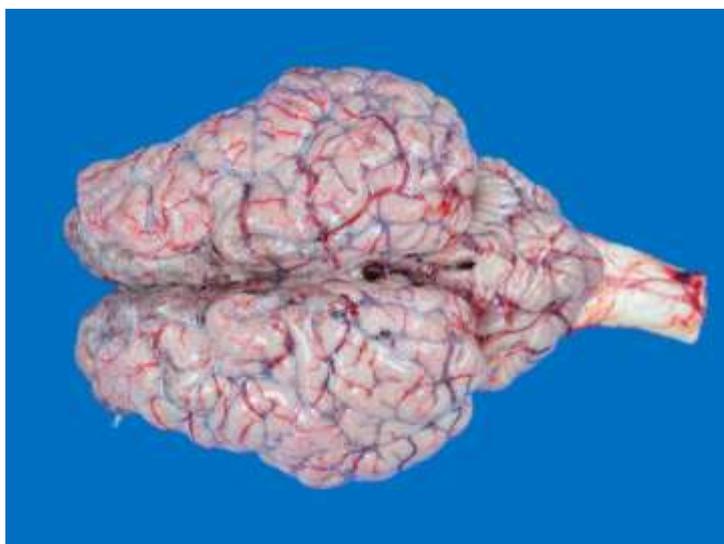


Figura 9. Achados macroscópicos da raiva bovina. Os vasos sanguíneos das meninges estão acentuadamente ingurgitados (hiperemia).

O próximo passo é a coleta de amostras de tecidos para exames laboratoriais. A coleta deve seguir as recomendações do Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora, enfatizando a importância da coleta do tronco encefálico, medula espinhal e gânglio trigeminal. Este ponto merece destaque, pois, devido à distribuição e intensidade das lesões da raiva variarem conforme a evolução do quadro clínico (decorrente da patogenia da doença), muitas vezes, as lesões estarão restritas apenas à medula espinhal, tronco encefálico e ao gânglio trigêmeo. Desta forma, caso a coleta seja feita apenas do telencéfalo (popularmente chamado de córtex), é muito provável que ocorram diagnósticos falso negativos.



Figura 10. Gânglio trigeminal, *rete mirabile* e hipófise (GRH). O gânglio trigeminal (asteriscos) é um dos principais tecidos a ser coletado nos casos suspeitos de raiva. A *rete mirabile* (setas) é importante para a realização do diagnóstico de febre catarral maligna.

Com relação ao diagnóstico laboratorial, a raiva apresenta lesões histológicas características de encefalite/meningoencefalite/mielite não supurativas, com gliose, neuronofagia, necrose neuronal e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, visualizados principalmente nos neurônios de Purkinje (cerebelo); estes corpúsculos, quando presentes, são histologicamente confirmatórios para o diagnóstico de raiva. Entretanto, nem sempre sua visualização ocorre, os exames laboratoriais oficiais, como a prova de imunofluorescência direta e a prova biológica, são necessários para a confirmação do diagnóstico. Como foi demonstrado anteriormente, é por esta razão que se faz necessário o encaminhamento de partes do tronco encefálico e medula espinhal para a realização do exame histopatológico e das provas oficiais do MAPA, evitando ao máximo, dessa forma, a ocorrência de diagnósticos falso negativos.

Caso clínico 2. Botulismo

O caso ocorreu em um confinamento que possuía 1600 bovinos machos inteiros, com idade entre 18 e 24 meses, alguns da raça Nelore, outros da raça Brangus. Logo após receberem a ração do período da tarde, trinta e cinco bovinos apresentaram sinais clínicos de decúbito esternal e acentuada dificuldade respiratória. O confinamento era dividido em 20 lotes, cada um contendo 80 animais. Os casos ocorreram em bovinos de diferentes

raças, provenientes de 15 lotes distintos. A dieta destes era baseada em “silagem de grão de milho úmida”, feno de tifton e soja; estes já estavam confinados há 90 dias e, portanto, estavam adaptados a esta dieta. Diariamente ureia e antibióticos ionóforos eram fornecidos. O manejo sanitário consistia em vacina polivalente e vermífugo à base de albendazol logo na introdução dos animais no confinamento. Após o adoecimento dos bovinos, a alimentação foi imediatamente suspensa, porém, na manhã seguinte, cento e cinquenta bovinos foram encontrados mortos e outros 300 apresentavam sinais clínicos caracterizados por dificuldade em se movimentar, tentativas de se levantar, porém incapacidade de permanecer em estação, decúbito esternal prolongado, com a cabeça posicionada no flanco, respiração abdominal bifásica, diminuição generalizada da sensibilidade, flacidez dos membros pélvicos e língua e paralisia de cauda. Próximo à morte, o decúbito era lateral.



Figura 11. Botulismo alimentar em bovinos confinados. Decúbito esternal e posicionamento da cabeça próxima ao flanco

Os bovinos foram necropsiados e não apresentaram alterações macroscópicas significativas. Fragmentos de todos os órgãos foram colhidos e imersos em formol a 10% para exame histopatológico; amostras adicionais de fígado (250g), conteúdo ruminal (250g) e alça intestinal (15cm de comprimento) foram encaminhados refrigerados ou congelados para exame laboratorial de botulismo (soroneutralização e prova biológica), enquanto fragmentos de tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal, igualmente congelados ou refrigerados, foram encaminhados para exame laboratorial de raiva (imunofluorescência direta – IFD - e inoculação intracerebral em camundongos). Nenhum bovino apresentou lesões histológicas significativas e dois destes foram positivos para a toxina botulínica tipo C nas provas de soroneutralização e biológica. Nos

outros 18 bovinos necropsiados, a toxina não foi encontrada. Durante a inspeção do alimento fornecido, observou-se que o feno apresentava algumas partes umedecidas e compactadas, e a silagem de milho fornecida estava com aspecto diferente das demais, contendo grumos grandes, compactos, mofados e de odor pútrido. Segundo os funcionários da fazenda, os bovinos leiteiros e o rebanho de ovino também recebiam feno e farelo de soja, porém não recebiam o milho. Nenhum caso foi observado nestes grupos de animais. Os casos continuaram ocorrendo por um período de quatro dias; no final do surto, foram contabilizadas 1090 mortes e 10 animais recuperados. Os bovinos que sobreviveram foram tratados com 50 a 100.000UI/animal de antitoxina.



Figura 12. Grumos compactos de milho administrados para os bovinos. Essa pode ser uma fonte de botulismo alimentar em animais confinados.

Comentário

Ao ser analisado na forma como está descrito acima, com o conjunto de todas as informações relevantes referentes ao caso, o diagnóstico de botulismo é facilmente realizado, pois atende todos os critérios estabelecidos para o diagnóstico conclusivo. Porém, na situação real, isto não é tão simples devido aos motivos que serão discutidos a seguir.



Figura 13. Fluxo geral do processo para o diagnóstico de botulismo. Adaptado de Le Maréchal et al., 2016.

Inicialmente, se pensarmos que os casos iniciais eram agudos, caracterizados por relutância em se movimentar e passos lentos, e iniciados logo após a alimentação, nossas primeiras suspeitas seriam doenças com estas características, como intoxicação por ureia, uma vez que os bovinos eram alimentados com este produto. Considerando a patogenia desta intoxicação, a suspensão do fornecimento do alimento aos bovinos determinaria o não aparecimento de novos casos; entretanto, neste surto, isto não ocorreu. Assim, poderíamos excluir esta suspeita e aderir novas possibilidades. Os elevados coeficientes de morbidade e letalidade observados já no segundo dia de surto mostram que o problema tem origem em algo que todos os bovinos tiveram acesso, ou seja, alimento, água, ou produto aplicado. Devido ao fato de não haver histórico recente de aplicação de produtos químicos e que os casos estavam ocorrendo em diferentes lotes, que tinham bebedouros independentes, podemos excluir causas iatrogênicas e a água como fontes do agente etiológico.

Por isso, nossa lista de suspeitas principais deve, a partir de agora, incluir doenças que causem sinais semelhantes aos descritos e que estejam associados à alimentação. Neste grupo temos o botulismo, intoxicação por toxinas de *Aspergillus clavatus*,

intoxicação por antibióticos ionóforos e intoxicação por *Senna* spp. Deste grupo de doenças, a intoxicação por *Senna* spp. causa mioglobinúria e lesões musculares caracterizadas por áreas extensas de palidez principalmente nos grupos musculares dos membros pélvicos, as quais são vistas histologicamente como áreas de necrose de coagulação. A ausência destas lesões nos bovinos necropsiados eliminam esta possibilidade da lista de suspeitas.



Figura 14. Intoxicação por *Senna* spp. em um bovino. Músculo esquelético apresentando áreas pálidas extensas intercaladas com áreas normais.

Percebe-se que nossa lista de diagnósticos diferenciais agora resume-se a duas doenças, das quais uma caracteriza-se por paralisia flácida dos músculos locomotores, respiratórios e alimentares, e a outra por lesão nos neurônios do sistema nervoso central. Assim, conhecendo a **patogenia** destas doenças, podemos determinar a partir de um exame clínico minucioso e bem feito que os sinais clínicos observados são compatíveis com o botulismo e não com intoxicação por toxinas de *A. clavatus*. Desta forma, podemos ter um diagnóstico presuntivo relativamente rápido e baseado em fortes evidências, o que nos permite a adoção de medidas de controle antes mesmo da realização dos exames laboratoriais. Adicionalmente, esta conduta nos permite que, durante a necropsia, observemos cuidadosamente todos os órgãos ou sistemas, principalmente aqueles relacionados às nossas suspeitas, de modo que as amostras de tecidos necessárias para o diagnóstico destas doenças também sejam colhidos. A conduta diagnóstica, além de possibilitar a realização de um diagnóstico precoce e sua posterior confirmação, também permite a identificação de possíveis erros na suspeita inicial.

Caso clínico 3. Carbúnculo sintomático

Em uma propriedade, de oito bezerros mortos, cinco apresentavam andar cambaleante, depressão e dificuldade de locomoção, e evoluíam para decúbito lateral e morte em até dois dias após o início destes sinais; dois foram encontrados mortos sem sinais clínicos prévios, e um foi encontrado em decúbito esternal, apático, e com perda de sensibilidade dos membros torácicos e pélvicos, os quais, à palpação, estavam acentuadamente crepitantes. A propriedade possuía o total de quatro lotes:

- Lote 1: continha o total de 119 bezerros de nove meses de idade, que receberam uma dose de vacina polivalente contendo cepas de *C. chauvoei*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* e *C. sordelii*. A dose de reforço seria realizada durante o manejo de desmama, quando os animais tivessem oito meses de idade - quatro meses após a primeira dose - porém, o reforço não foi realizado. Seis animais adoeceram.
- Lote 2: composto por 400 bezerros que receberam as duas doses preconizadas da vacina (uma aos quatro meses e outra aos oito meses de idade). Nenhum bovino adoeceu
- Lote 3: composto por quatro vacas leiteiras (adultas) e nove bezerros. Nenhuma vaca e bezerro haviam sido vacinados contra “clostridioses”. Dois bezerros adoeceram.
- Lote 4: continha 1000 bezerros não desmamados com idade entre quatro e seis meses, que receberam a primeira dose da vacina aos quatro meses de idade e ainda não haviam recebido o reforço até o momento do surto. Nenhum bezerro adoeceu.

Após o adoecimento dos dois animais do lote 3, todo o lote foi vacinado.

Na necropsia do primeiro bovino havia áreas extensas de necrose e hemorragia na musculatura dos membros pélvicos, torácicos e diafragma, com bolhas de gás (enfisema).



Figura 15. Carbúnculo sintomático em um bezerro. Musculatura esquelética com necrose e hemorragia focalmente extensa e enfisema).



Figura 16. Carbúnculo sintomático em um bezerro. Ao ser imerso em formol a 10%, o músculo esquelético flutua.

Fragmentos de todos os órgãos foram colhidos em formol a 10% para exame histopatológico, e amostras adicionais de músculo esquelético foram encaminhadas frescas para realização de PCR. Após o estabelecimento do diagnóstico de carbúnculo sintomático neste animal, outros dois bezerros que estavam doentes receberam tratamento à base de penicilina e dexametasona; destes, um morreu. Além deste procedimento, os bezerros do lote 1 (de 119 animais) receberam a dose vacinal de reforço juntamente com um frasco de penicilina (60.000.000 UI/animal) como forma de prevenção. Neste mesmo dia, um segundo animal foi encontrado morto e submetido à necropsia; nesta, havia apenas áreas de necrose e hemorragia na musculatura do dorso e língua. Posteriormente, outros três animais que adoeceram, dois destes do lote de vacas leiteiras, foram tratados

de forma semelhante aos dois primeiros bezerros. Após seis a sete dias de tratamento contínuo, os quatro animais recuperaram-se.

Comentário

O presente caso exemplifica como a realização de uma necropsia com a interpretação correta dos achados pode elucidar uma causa de morte e permitir a adoção imediata de medidas de controle de um surto, e como a demora na realização deste procedimento pode resultar em perdas econômicas.

Considerando que as lesões macroscópicas nas miosites causadas por clostrídios histotóxicos são características, é possível a realização do diagnóstico durante a necropsia. Por outro lado, ressalta-se que, sem a realização da necropsia, nenhum achado laboratorial, como o isolamento de clostrídios ou sua detecção por técnicas moleculares têm valor diagnóstico. Isto se deve ao fato de que, após a morte do animal e a consequente formação de um ambiente de anaerobiose na carcaça, clostrídios que estavam presentes na forma de esporos são ativados e passam a produzir toxinas, inviabilizando a detecção do agente como o responsável pelas lesões observadas no exame macroscópico.

Entretanto, a observação de lesões compatíveis mesmo em animais em processo de autólise tem significado diagnóstico, isto porque a **patogenia** dos mecanismos envolvidos na lesão tecidual, com consequente resposta inflamatória à injúria, não pode ocorrer após a morte do animal. Outro ponto relevante é que, no presente caso, o primeiro bovino necropsiado apresentava lesões características e em locais de fácil observação. Já no segundo bovino, a observação das lesões exigiu a avaliação sistemática e minuciosa de todos os músculos. Se a ordem da realização das necropsias fosse inversa, este fato poderia ocasionar um atraso no diagnóstico ou mesmo uma falha neste, resultando em um diagnóstico inconclusivo, pois a não realização do exame sistemático e minucioso de todos os músculos resultaria na conclusão errada de que não havia lesões compatíveis com carbúnculo sintomático.

Isso reforça a importância de que, antes de realizarmos a necropsia, deve ser feito o exercício mental da elaboração de uma lista com as principais suspeitas e quais os achados seriam esperados em cada uma delas. Esse raciocínio deve contemplar tanto os aspectos epidemiológicos (raça, idade, sexo, entre outros) quanto os sinais clínicos. Tomando como exemplo o presente caso, faríamos uma lista com as principais causas de mortes em bezerros de oito a nove meses de idade (só estes estavam adoecendo) com

evolução aguda (muitos foram encontrados mortos). Então, poderíamos elaborar uma lista com as seguintes doenças: carbúnculo sintomático, salmonelose septicêmica, babesiose e anaplasiose. O próximo passo seria pensar quais os achados de necropsia ocorrem em cada uma destas e definir quais as amostras devem ser coletadas e como devem ser acondicionadas para exames laboratoriais. Para exercitar este raciocínio, vamos acompanhar o exemplo abaixo:

Tabela 2. Lista de diagnósticos diferenciais de doenças de bovinos jovens, seus respectivos achados de necropsia, sinais clínicos, tecidos a serem coletados e forma de acondicionamento destes.

Suspeita	Macroscopia	Exames laboratoriais	Tecidos a serem coletados	Forma de conservação
Carbúnculo sintomático	<ul style="list-style-type: none"> - Áreas vermelho escuras (necrose e hemorragia) nos músculos esqueléticos, diafragma, língua, entre outros, com bolhas de gás (enfisema) - Os músculos afetados podem flutuar quando submersos no formol - Carcaça com odor de “manteiga rançosa” - Líquido na cavidade torácica - Fibrina e hemorragia no saco pericárdio e na pleura pulmonar - Edema de tecido subcutâneo 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia - PCR - Cultura bacteriana - Imuno-histoquímica 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: todos os órgãos - Demais exames: músculo esquelético afetado 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: formol a 10% - PCR e cultura bacteriana: frescos ou refrigerados*
Salmonelose	<ul style="list-style-type: none"> - Pulmões não colabados e vermelho escuros - Fígado aumentado de volume e alaranjado - Esplenomegalia - Vesícula biliar com fibrina - Fibrina na mucosa intestinal - Icterícia (às vezes) 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia - Cultura bacteriana 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: todos os órgãos - Cultura bacteriana: pulmão, fígado, bile, baço e intestino 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: formol a 10% - Cultura bacteriana: frescos ou refrigerados*
Babesiose	<ul style="list-style-type: none"> - Esplenomegalia - Icterícia - Rins vermelho escuros - Urina vermelho escura (hemoglobinúria) - Fígado aumentado de tamanho e alaranjado - Córtex telencefálico vermelho-cereja (somente na babesiose cerebral) 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia - Histoquímica - Pesquisa de hemoparasitas 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: todos os órgãos - Histoquímica: rins, baço, fígado e encéfalo - Pesquisa de hemoparasitas: córtex telencefálico e baço 	<ul style="list-style-type: none"> - Histopatologia: formol a 10% - Histoquímica: formol a 10% (técnicas de Azul de Metileno e Azul de Toluidina) - Pesquisa de hemoparasitas: frescos ou refrigerados*

Anaplasmosse	- Icterícia - Esplenomegalia	- Histopatologia - Pesquisa de hemoparasitas - Hemograma	- Histopatologia: todos os órgãos - Pesquisa de hemoparasitas: baço	- Histopatologia: formol a 10% - Pesquisa de hemoparasitas: frescos ou refrigerados
---------------------	---------------------------------	--	--	--

* Envio ao laboratório em, no máximo, 24 horas.

Como pode-se perceber, algumas lesões são comuns a várias das suspeitas, enquanto outras são exclusivas de algumas doenças. Estas lesões fazem parte de um critério de diagnóstico que necessariamente precisa ser atendido para o estabelecimento do diagnóstico conclusivo. Já os demais, embora sejam importantes na avaliação do quadro como um todo, pois muitas vezes sua ausência elimina uma suspeita, sua presença unicamente não é suficiente para elaborarmos um diagnóstico.

Caso clínico 4. Intoxicação por abamectina

Em uma propriedade de exploração extensiva, um lote de 52 bezerros de um até 15 dias de idade foi afetado. O manejo após o nascimento incluía a desinfecção tópica do umbigo com antisséptico comercial e administração de doramectina a 1% na dose de 1ml/animal, através da via subcutânea. Este manejo era realizado até o segundo dia de vida dos bezerros. No período da manhã, um dia após este manejo, quatro bezerros de três dias de vida, pesando em média 25kg, foram encontrados mortos e, então, os demais bezerros do lote que apresentaram sinais clínicos foram tratados para as suspeitas iniciais de tristeza parasitária bovina e pneumonia com medicamentos à base de diaceturato de diazoaminodibenzamidina e terramicina, respectivamente. Três dias depois das mortes iniciais, mais três bezerros morreram e dois estavam doentes, todos com três dias de vida. Durante o exame clínico realizado por médicos veterinários, foram notados tremores em diversos grupos musculares, incapacidade dos bezerros em permanecerem em estação, e respiração difícil e ruidosa. Inicialmente, três bezerros foram necropsiados e não apresentaram lesões macroscópicas. Na necropsia do quarto bezerro, evidenciou-se espessamento do umbigo, com acúmulo de pus à abertura do coto e na veia umbilical, e fígado aumentado de volume, com os bordos arredondados e superfície capsular apresentando áreas alaranjadas. Não houve lesões microscópicas em nenhum dos bezerros. Diante da ausência de achados anatomopatológicos e dados epidemiológicos que justificassem os sinais clínicos, realizou-se uma investigação epidemiológica aprofundada visando identificar possíveis causas do quadro clínico-patológico

manifestado pelos animais. Durante a investigação, constatou-se que os bezerros que não tinham o umbigo desinfetado logo após o nascimento e que apresentavam espessamento do cordão umbilical eram tratados com uma mistura à base de triclorfon e fentione. Diante desta informação, suspeitou-se da possibilidade de intoxicação por organofosforados. Porém, a mesma foi descartada pelo fato de que os bezerros que estavam adoecendo tiveram seu umbigo desinfetado imediatamente após o nascimento e, portanto, não receberam esta mistura. Após a exclusão desta possibilidade, direcionou-se a investigação no sentido de identificar alguma possível administração acidental de princípios tóxicos capazes de provocarem o quadro clínico observado, mas sem provocarem lesões macroscópicas e microscópicas. Durante esta etapa investigativa, em um primeiro momento, foi questionada ao médico veterinário a possibilidade de administração de abamectina nos bezerros, porém a mesma foi negada. No entanto, após tal questionamento, o mesmo constatou que o produto à base de doramectina prescrito para o tratamento dos recém-nascidos se esgotou e um dos funcionários, inadvertidamente, utilizou um produto à base de abamectina a 1%, com dosagem igual à utilizada na administração do princípio anterior (1ml/animal). Diante desta informação, a administração de abamectina foi suspensa e nenhum outro animal adoeceu. As mortes se concentraram em um período de três dias, coincidindo com o período de administração deste princípio.

Comentário

A conduta diagnóstica adotada no presente caso que possibilitou a elaboração de uma suspeita clínica e conduziu a investigação epidemiológica que levou à identificação da fonte da intoxicação. O diagnóstico de intoxicação por abamectina apenas ocorreu devido à associação do histórico, anamnese, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatológicos, e exames complementares microbiológico e parasitário. Neste contexto, as principais causas de morte em bezerros com sinais clínicos compatíveis com os observados neste surto foram avaliadas e descartadas por não preencherem os critérios de diagnósticos. A suspeita de salmonelose septicêmica que pode se caracterizar clinicamente por distúrbios respiratórios severos foi descartada devido à ausência de lesões sugestivas na necropsia, principalmente lesões pulmonares que justificassem o quadro respiratório observado nos animais. A exclusão desta enfermidade da lista de diagnósticos foi feita através dos resultados negativos de cultura bacteriana e da ausência

de lesões histológicas compatíveis com a doença. A suspeita de babesiose foi descartada pela ausência de lesões macroscópicas compatíveis com a doença e pelo resultado negativo para a pesquisa de hematozoários.



Figura 17. Babesiose cerebral em bezerros. Nota-se a coloração vermelha-escura distribuída difusamente pelo telencéfalo e cerebelo.

Um dos bezerros necropsiados apresentava espessamento e acúmulo de pus na região umbilical; este fator pode levar a meningites neonatais, entretanto, esta patologia foi descartada devido à ausência de lesões macroscópicas e microscópicas compatíveis, além dos resultados negativos nos cultivos bacterianos. O fato de todos os casos ocorrerem em um período de três dias, e que todos os bezerros nascidos nesses dias foram acometidos levou à suspeita de um quadro tóxico. Inicialmente, suspeitou-se de intoxicação por organofosforados devido ao quadro clínico e à ausência de lesões macroscópicas e microscópicas. Embora o uso de produtos organofosforados para o tratamento de bezerros recém-nascidos tenha sido relatado, a suspeita foi descartada pelo fato de que os mesmos eram tratados com este produto antes da ocorrência das mortes e não apresentavam sinais da intoxicação.

A exclusão de todas as doenças descritas acima conduziu a investigação visando encontrar uma possível causa de sinais nervosos com conseqüente insuficiência respiratória que não estivesse relacionada a lesões macroscópicas e histológicas relevantes. Considerando que o quadro clínico era fortemente sugestivo de intoxicação por abamectina e que esta possibilidade foi inicialmente desconsiderada em virtude da informação de que o produto não era usado na propriedade, optou-se por inspecionar os produtos utilizados, e assim constatou-se o uso deste princípio ativo em doses acima da preconizada, levando à morte de vários animais.

Um erro muito comum entre os veterinários e até mesmo patologistas é pensar que uma alteração macroscópica tem menor valor para o diagnóstico do que uma lesão histológica. Ambas possuem o mesmo valor, se são corretamente interpretadas. Algo não observado macroscopicamente pode ser observado microscopicamente, e vice-versa.

Referências Bibliográficas

MAXIE, M.G.; MILLER M.A. Introduction to the Diagnostic Process. In: MAXIE M.G. (Ed), Pathology of domestic animals. 6th edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, 2016, pp.1-15.

Le MARÉCHAL, C.; VOUDSTRA, C.; FACH, P. Clostridial Neurotoxic infections – Botulism. In: UZAL, F.A.; SONGER, J.G.; PRESCOTT, J.F.; POPOFF, M.R. (Eds), Clostridial diseases of animals. John Wiley & Sons, 2016, pp.303-330.